THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

SCIENCES BIOLOGIQUES

PAR

Roland GILET

ETUDE, AU MOYEN DES COURBES DE SURVIE, DE LA RESTAURATION CELLULAIRE APRES IRRADIATION CHEZ LES CHLORELLES

Soutenue le 6 novembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM.	L. NEEL	Président
	P. OZENDA	Rapporteur
	F. BARNOUD	Examinateur
	M. TUBIANA	Membre invité

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

SCIENCES BIOLOGIQUES

PAR

Roland GILET

ETUDE, AU MOYEN DES COURBES DE SURVIE, DE LA RESTAURATION CELLULAIRE APRES IRRADIATION CHEZ LES CHLORELLES

Soutenue le 6 novembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM.	L. NEEL	Président
	P. OZENDA	Rapporteur
	F. BARNOUD	Examinateur
	M. TUBIANA	Membre invité

FACULTE DES SCIENCES DE GRENOBLE

LISTE DES PROFESSEURS

Doyen honoraire : Monsieur M. MORET

Doyen : Monsieur E. BONNIER

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	NEEL Louis	Physique Expérimentale
	KRAVTCHENKO Julien	Mécanique Rationnelle
	CHABAUTY Claude	Calcul Différentiel et intégral
	BENOIT Jean	Radioélectricité
	CHENE Marcel	Chimie Papetière
	FELICI Noël	Electrostatique
	KUNTZMANN Jean	Mathématiques Appliquées
	BARBIER Reynold	Géologie Appliquée
	SANTON Lucien	Mécanique des Fluides
	OZENDA Paul	Botanique
	FALLOT Maurice	Physique Industrielle
	KOSZUL Jean-Louis	Mathématiques
	GALVANI Octave	Mathématiques
	MOUSSA André	Chimie Nucléaire
	TRAYNARD Philippe	Chimie Générale
	SOUTIF Michel	Physique Générale
	CRAYA Antoine	Hydrodynamique
	REULOS René	Théorie des Champs
	BESSON Jean	Chimie Minérale
	AYANT Yves	Physique Approfondie
	GALLISSOT François	Mathématiques
Mlle	LUTZ Elisabeth	Mathématiques
MM.	BLAMBERT Maurice	Mathématiques
	BOUCHEZ Robert	Physique Nucléaire
	LLIBOUTRY Louis	Géophysique
	MICHEL Robert	Minéralogie et pétrographie
	BONNIER Etienne	Electrochimie et Electrométallurgie
	DESSAUX Georges	Physiologie Animale
	PILLET Emile	Physique Industrielle - Electrotechnique
	YOCCOZ Jean	Physique Nucléaire théorique
	DEBELMAS Jacques	Géologie Générale
	GERBER Robert	Mathématiques
	PAUTHENET René	Electrotechnique
	MALGRANGE Bernard	Mathématiques Pures
	VAUQUOIS Bernard	Calcul Electronique
	BARJON Robert	Physique Nucléaire
	BARBIER Jean-Claude	Physique
MM.	SILBER Robert	Mécanique des Fluides
	BUYLE-BODIN Maurice	Electronique
	DREYFUS Bernard	Thermodynamique
	KLEIN Joseph	Mathématiques
	VAILLANT François	Zoologie et Hydrobiologie
	ARNAUD Paul	Chimie
	SENGEL Philippe	Zoologie
	BARNOUD Fernand	Biosynthèse de la Cellulose
	BRISSONNEAU Pierre	Physique
	GAGNAIRE Didier	Chimie Physique
Mme	KOFLER Lucie	Botanique
MM.	DEGRANGE Charles	Zoologie
	PEBAY-PEROULA Jean-Claude	Physique
	RASSAT André	Chimie Systématique
	DUCROS Pierre	Cristallographie Physique
	DODU Jacques	Mécanique appliquée I.U.T.
	ANGLES D'AURIAC Paul	Mécanique des Fluides
	LACAZE Albert	Thermodynamique
	GASTINEL Noël	Analyse numérique
	GIRAUD Pierre	Géologie
	PERRET René	Servo-mécanismes
	PAYAN Jean Jacques	Mathématiques pures
	CAUQUIS Georges	Chimie
	RENARD Michel	Thermodynamique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	GIDON Paul	Géologie
	BARBIER Marie Jeanne	Electrochimie
	SOUTIF Jeanne	Physique
	COHEN Joseph	Electrotechnique
	DEPASSEL R.	Mécanique des Fluides
	GLENAT René	Chimie
	BARRA Jean	Mathématiques appliquées
	COUMES André	Electronique
	PERRIAUX Jacques	Géologie et minéralogie
	ROBERT André	Chimie papetière
	BIARREZ Jean	Mécanique Physique
	BONNET Georges	Electronique
	BONNETAIN Lucien	Chimie minérale
	DEPOMMIER Pierre	Physique nucléaire - Génie atomique
	HACQUES Gérard	Calcul numérique
	POLOUJADOFF Michel	Electrotechnique
	KAHANE Josette	Physique
	BONNIER Jane	Chimie
	VALENTIN Jacques	Physique
	REBECQ Jacques	Biologie
MM.	DEPORTES Charles	Chimie
	SARROT-REYNAULD Jean	Géologie
	BERTRANDIAS J. Paul	Mathématiques Appliquées
	AUBERT Guy	Physique
	DESRE Pierre	Chimie
	LAURENT Pierre	Mathématiques Appliquées
	CARLIER Georges	Biologie Végétale
	DOLIQUE Jean Michel	Electronique

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	RODRIGUES Alexandre	Mathématiques Pures
	RADHAKRISHNA	Thermodynamique

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	LANCIA Roland	Physique atomique
	BOUCHE Liane	Mathématiques
	KAHANE André	Physique générale
	BRIERE Georges	Physique
	LAJZEROWICZ Joseph	Physique
	BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques Pures
	LONGEQUEUE J. Pierre	Physique
	SOHM Jean Claude	Electrochimie
	ZADWORNY François	Electronique
	DURAND Francis	Chimie Physique
	PFISTER Jean Claude	Physique
	CHIBON Pierre	Biologie Animale
	IDELMAN Simon	Physiologie Animale
	BLOCH Daniel	Electrotechnique I.P.
	MARTIN-BOUYER Michel	Chimie (C.S.U. Chambéry)
	SIBILLE Robert	Construction mécanique (I.U.T.)
	BRUGEL Lucien	Energétique I.U.T.
	BOUVARD Maurice	Hydrologie
	RICHARD Lucien	Botanique
	PELMONT Jean	Physiologie animale
	BOUSSARD Jean Claude	Mathématiques Appliquées (I.P.G.)
	MOREAU René	Hydraulique (I.P.G.)
	ARMAND Yves	Chimie I.U.T.
	BOLLIET Louis	Informatique I.U.T.
	KUHN Gérard	Energétique I.U.T.
	PEFFEN René	Chimie-Physique I.U.T.
	GERMAIN Jean Pierre	Mécanique
	JOLY Jean René	Mathématiques Pures
Mlle	PIERY Yvette	Biologie animale
MM.	BERNARD Alain	Mathématiques Pures
	MOHSEN Tahsin	Biologie (C.S.U. Chambéry)
	CONTE René	Mesures Physiques I.U.T.
	LE JUNTER Noël	Génie électrique électronique I.U.T.
	LE ROY Philippe	Génie Mécanique I.U.T.
	ROMIER Guy	Techniques Statistiques quantitatives I.U.T.
	VIALON Pierre	Géologie
	BENZAKEN Claude	Mathématiques Appliquées
	MAYNARD Roger	Physique
	DUSSAUD René	Mathématiques (C.S.U. Chambéry)
	BELORIZKY Elie	Physique (C.S.U. Chambéry)
Mme	LAJZEROWICZ Jeannine	Physique (C.S.U. Chambéry)
	JULLIEN Pierre	Mathématiques Pures
Mme	RINAUDO Marguerite	Chimie
	BLIMAN Samuel	E.I.E.
	BEGUIN Claude	Chimie organique
	NEGRE Robert	Mécanique I.U.T.
	BUISSON Roger	Physique I.U.T.
	IVANES Marcel	Electronique I.U.T.

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIEES

MM.	YAMADA Osamu	Physique du Solide
	NAGAO Makoto	Mathématiques Appliquées
	MAREZIO Massimo	Physique du Solide
	CHEEKE John	Thermodynamique
	BOUDOURIS Georges	Radioélectricité
	ROZMARIN Georges	Chimie Papetière

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

A - Effets des rayonnements sur la multiplication cellulaire des Chlorelles

B - Généralités sur les courbes de survie

1 - Définitions
2 - Intérêt des courbes de survie
3 - Modèles mathématiques appliqués aux courbes de survie
4 - Essai de classification des modèles mathématiques relevés dans la bibliographie

1. Courbes exponentielles
2. Courbes sigmoïdes
3. Courbes présentant deux parties distinctes

CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES

A - Matériel vivant

1 - Souche utilisée
2 - Milieu de culture
3 - Cultures souches
4 - Cultures réalisées

a) Contrôle des cultures
b) Types de cultures

- Cultures sur milieu nutritif gélifié
- Cultures denses en milieu liquide
- Cultures synchronisées

B - Moyens d'irradiation utilisés

1 - Irradiations aux rayons γ
2 - Irradiations aux rayons X
3 - Dosimétrie

CHAPITRE III -

Première partie - ANALYSE DE LA SURVIE CLONALE CHEZ LES CHLORELLES

1 - Mise en évidence de la survie clonale chez les Chlorelles
2 - Etude de la formation des clones
3 - Détermination des taux de survie clonale

Deuxième partie - ANALYSE DES COURBES DE SURVIE

A - Remarques préliminaires

1 - Généralités
2 - Reproductibilité des résultats
3 - Effets du débit de dose

B - Résultats obtenus en irradiations aiguës

1 - Courbes obtenues avec des échantillons prélevés dans des cultures en masse au plateau de croissance
2 - Courbes obtenues à partir d'échantillons prélevés dans des cultures synchronisées
3 - Etude des phénomènes de restauration chez les Chlorelles

a) Généralités
b) Les processus de restauration en fonction du temps T
c) Les processus de restauration en fonction de la dose D_1
d) Fractionnements répétés
e) Influence de l'anoxie et d'une température de 0°C sur les processus de restauration
f) Les processus de restauration en fonction du cycle cellulaire

C - Irradiations subaiguës

CHAPITRE IV - RECHERCHE D'UN MODELE POUVANT RENDRE COMPTE DES RESULTATS EXPERIMENTAUX OBTENUS

Généralités
Rappel des résultats qualitatifs obtenus
Application de la théorie de la cible
Recherche d'une interprétation des résultats
Etude de l'hypothèse B
Etude de l'hypothèse A
Essai de modification de l'hypothèse B

- Application numérique aux courbes de survie obtenues sans fractionnement des doses
- Application théorique aux courbes obtenues par fractionnement multiple
- Application numérique aux résultats expérimentaux

Remarques sur le modèle proposé

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

Au moment d'écrire les remerciements qui suivent, je tiens à souligner qu'il n'est pas possible de citer tous ceux qui ont contribué à la réalisation d'une thèse. Si un nom d'auteur figure sur la première page, ce n'est pas que cette thèse soit l'oeuvre d'un seul ; ce nom désigne le "maître d'oeuvre" du travail.

Monsieur le Professeur L. NEEL, Membre de l'Institut, Directeur du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, a bien voulu m'autoriser à effectuer ce travail dans le cadre de mes activités professionnelles. Je lui exprime ma respectueuse gratitude pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce Jury.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur M. TUBIANA, Chef du Département des Radiations à l'Institut Gustave Roussy, d'avoir discuté mon travail d'une manière approfondie et d'avoir établi les contacts avec les radiobiologistes de la cellule de Mammifère, qui me sont et me seront très profitables. Il ne m'est pas possible de remercier Monsieur le Professeur TUBIANA sans y associer Monsieur le Docteur E. MALAISE.

Monsieur le Professeur F. BARNOUD a accepté de juger ce travail. Je l'en remercie bien vivement.

Monsieur le Professeur OZENDA, Chef du laboratoire de Biologie Végétale du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, a une place particulière dans ces remerciements. C'est lui qui m'a proposé d'étudier l'effet des rayonnements sur les microorganismes chlorophylliens et qui m'a confié la responsabilité d'un petit groupe de recherches dans ce domaine. Il m'a permis de conduire mon travail dans une grande liberté, même quand il doutait de l'aboutissement de mes efforts. Je lui suis reconnaissant de la confiance qu'il m'a témoignée et de tout ce qu'il a fait pour moi.

J'ai trouvé, au Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, une ambiance propice à la réalisation d'un travail scientifique grâce aux moyens dont j'ai pu disposer, à l'infrastructure qui permet au chercheur d'être tout à ses problèmes, aux contacts humains avec des Scientifiques divers. Je dois mentionner et remercier Monsieur J. TERRIER, Chef du laboratoire de Calcul Numérique ; il s'est fait biologiste pour me comprendre, a discuté chacun de mes résultats expérimentaux et en a tiré des modèles qui élargissaient leur domaine d'application et incitaient à de nouvelles expérimentations. Je dois à la Section d'Application des Radioéléments d'avoir pu effectuer les irradiations aux rayons gamma. Je remercie également Madame BASSI et son service de dactylographie pour la réalisation matérielle de cet ouvrage.

Je dois à Monsieur G. GIRAUD, Chef du laboratoire de Botanique de l'Ecole

Normale Supérieure, et à Mademoiselle N. HAUSWIRTH, tous les contrôles cytologiques des Chlorelles de mes cultures effectués à l'aide du microscope électronique. Je leur suis reconnaissant de leur travail patient et de l'interprétation des images obtenues.

Ce travail a bénéficié des conseils de Monsieur le Professeur V. NIGON, de la Faculté des Sciences de Lyon, de Messieurs P. GUERIN de MONTGAREUIL et P. PERREAU-LEROY, du Service de Radioagronomie de Cadarache. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

J'ai trouvé en Madame S. SANTIER une technicienne qui conduit son travail avec méthode, en réfléchissant à toutes les incidences de chaque geste et de chaque technique sur la qualité des résultats. C'est à elle que je dois la précision des courbes sur lesquelles s'appuie ce travail. Je la remercie ici très chaleureusement.

Je remercie aussi l'ensemble des membres du Laboratoire de Biologie Végétale avec une mention particulière pour Madame J. RAVIER qui a déchiffré mon écriture et pour Monsieur A. FREYCHET qui a mis au point et réalisé les montages de culture et d'irradiation.

ETUDE, AU MOYEN DES COURBES DE SURVIE, DE LA RESTAURATION CELLULAIRE APRES IRRADIATION CHEZ LES CHLORELLES

INTRODUCTION

Les courbes de survie clonale en radiobiologie cellulaire traduisent l'existence d'une relation continue entre la dose de rayonnement à laquelle est soumise une population de cellules et la fréquence des individus capables de se diviser et d'être chacun à l'origine d'un clone.

Ces courbes ont conduit à une explication statistique des phénomènes qui se déroulent au cours d'une irradiation, alors qu'auparavant on pensait que les rayonnements effectuaient une sélection cellulaire. La théorie de la cible, publiée par LEA en 1947 a marqué cette évolution.

Dès qu'un expérimentateur dispose de cultures de cellules isolées, il peut tracer des courbes de survie clonale. Ces courbes s'appliquent donc à un matériel vivant étendu et permettent d'utiles comparaisons.

Les courbes de survie reposent sur l'étude de la multiplication cellulaire, caractéristique fondamentale du monde vivant ; elles ont des applications en radiostérilisation et en radiothérapie ; elles ont souvent une forme relativement simple, ce qui semble paradoxal puisqu'on peut penser que c'est l'interaction de nombreux processus qui conduit à l'arrêt de la multiplication cellulaire. Cette forme simple facilite les comparaisons entre courbes ; c'est pourquoi l'étude des courbes de survie après irradiation est une des bases de la radiobiologie et qu'elle précède et dirige les études au niveau moléculaire.

Une deuxième grande étape de la radiobiologie a été la mise en évidence et l'étude des processus de restauration après irradiation aux rayons ultraviolets, puis aux rayonnements ionisants, sur les bactéries puis sur les autres cellules. Il faut ici mentionner particulièrement les travaux d'ELKIND sur les cellules de Mammifères. Actuellement, on considère que l'étude de la restauration cellulaire aide à comprendre comment une cellule maintient l'intégrité de l'information qu'elle contient et cette étude est nécessaire en radioprotection, radiostérilisation et radiothérapie.

Le travail exposé ici repose sur l'utilisation des Chlorelles comme matériel vivant. Les Chlorelles sont des eucaryotes chlorophylliens dépourvus de sexualité. Après irradiation aux rayonnements gamma ou X, elles présentent des courbes de survie du même type que celles de tous les autres eucaryotes et on peut penser étendre à toutes les cellules les résultats obtenus sur les Chlorelles. Parce que les techniques microbiologiques s'appliquent aux Chlorelles, nous avons pu obtenir des taux de survie très précis.

Il a fallu d'abord étudier les modalités de la survie clonale chez les Chlorelles avant d'aborder l'étude de la restauration au niveau cellulaire par la méthode du fractionnement des doses. L'originalité des résultats acquis a conduit à rechercher les schémas d'action des rayonnements qui puissent rendre compte des données expérimentales. Dans

l'état actuel de nos connaissances, un de ceux-ci s'est révélé suffisant pour donner une image cohérente de tous les résultats.

Ce travail sera exposé de la façon suivante :

- recensement des travaux effectués sur la survie des Chlorelles après irradiation et exposé des divers types de courbes de survie généralement rencontrés ;
- connaissance du matériel vivant et techniques d'étude ;
- valeur du matériel vivant dans le but poursuivi et résultats acquis ;
- recherche d'un modèle pouvant rendre compte des résultats expérimentaux obtenus ;
- discussion générale et conclusions.

CHAPITRE I

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

A - EFFETS DES RAYONNEMENTS SUR LA MULTIPLICATION CELLULAIRE DES CHLORELLES

Les données bibliographiques, bien que peu fournies en radiobiologie des Chlorelles, sont suffisantes pour affirmer que les Chlorelles sont un matériel vivant capable d'être utilisé avec profit dans un problème d'interprétation des courbes de survie. SMITH (1961) a publié une liste des travaux de radiologie pour l'ensemble des algues, y compris ceux qui ont trait à la concentration des radioisotopes par les algues.

Dans ce chapitre, l'étude bibliographique sera restreinte aux travaux portant sur les Chlorelles, qui ont guidé la mise en oeuvre de ce travail ; mention sera faite des résultats publiés après 1962 et auxquels on peut comparer les résultats qui seront exposés dans ce travail.

FORSSBERG (1933) observe au microscope les Chlorelles dispersées sur milieu gélifié. Il définit la mortalité par leur aspect cytologique et suit les premiers stades de développement des colonies. Quelques jours après une irradiation de 5 kR de rayons X, la mortalité varie de 27 à 91 % quand le débit de dose varie de 22 à 1620 $R.mn^{-1}$ où le maximum de mortalité est atteint (les expériences ont été effectuées jusqu'à 3225 $R.mn^{-1}$).

PIETSCHMANN (1937) étudie l'effet de 10 kR de rayons X d'énergie moyenne donnés en 5 à 10 mn à Chlorella vulgaris cultivée en goutte suspendue ou sur Agar après isolement des cellules au micromanipulateur. Cet auteur classe qualitativement les effets obtenus en trois degrés : 1) mort brutale, 2) croissance sans division conduisant à des cellules géantes, 3) nombre anormal de divisions avec retard dans la division. C'est en fonction de ces résultats que l'étude au microscope de la formation des colonies a été entreprise ici.

WETHERELL et KRAUSS (1957) donnent deux courbes de mortalité de Chlorella pyrenoidosa : 20 % de mortalité à 3 kR, 40 à 50 % à 6 kR, 70 à 90 % à 9 kR, près de 100 % à 12 kR. SUMERE et HOLM-HANSEN (1957) constatent que 8500 reps (environ 8000 rads) délivrés par les rayons γ du ^{60}Co inhibent la multiplication cellulaire. S'il n'y a pas d'erreur de dosimétrie de la part de ces auteurs, les souches qu'ils ont utilisées paraissent plus radiosensibles que la souche employée ici. Par contre, BONHAM et PALUMBO (1951) établissent que, pour Chlorella, la LD 50 (mortalité de 50 %) est de 40 kR pour des rayons X obtenus à 55 kV. Dans trois expériences identiques effectuées avec des rayons X obtenus à 200 kV, cette LD 50 prend les valeurs de 10, 20 et 25 kR, montrant une grande dispersion des résultats. Ces auteurs sont les premiers, dans le cas des Chlorelles, à

avoir lié l'effet à la dose par une relation exponentielle.

Il faut aussi mentionner les travaux de PORTER et KNAUSS (1954), de PORTER et WATSON (1954) qui trouvent que l'aptitude pour une Chlorelle à former des colonies sur gélose décroît quand la dose de rayons β reçue croît. Les cellules dont la multiplication est ralentie atteignent un diamètre plus grand que les cellules témoins.

Pour NAZIROV et KAMENEVA (1962), aux rayons γ la LD 50 serait de 100 kR chez Chlorella pyrenoidosa mais s'abaisserait à 50 kR pour les algues issues de clones qui ont survécu à une dose de 100 kR.

En recherchant la fréquence des mutations induites par les rayons X d'énergie faible et portant sur le système photosynthétique de Chlorella vulgaris, ZAKHAROV et TOUGARINOV (1964) donnent une courbe de survie clonale de cette algue : courbe de survie à épaulement avec des taux de survie de 10 % pour 40 kR, 1 % pour 60 kR, 0,01 % pour 80 kR.

Depuis que ce travail est commencé, POSNER et SPARROW (1964) ont publié une courbe de survie pour Chlorella pyrenoidosa exposée à une irradiation de 8 kR.mn^{-1} aux rayons γ du ^{60}Co : courbe à épaulement avec survie de 20 % pour 20 kR ; la partie exponentielle peut être décrite par les paramètres n = 1,8 et Do = 4 ; la radiosensibilité est plus grande si les algues ont reçu préalablement une irradiation chronique de 14 400 R en deux jours (POSNER, 1965). FÄHNRICH (1965) a également publié des courbes de survie de Chlorelles. ALTMANN et coll. (1968) ont étudié la radiosensibilité des Chlorelles synchronisées : ils mentionnent une dose létale de 90 % pour 40 kR ; le stade le plus sensible semble se placer juste avant le début de la phase S, suivi d'un rapide accroissement de la résistance au cours de la phase S.

B - GENERALITES SUR LES COURBES DE SURVIE

1 - Définitions

La survie se constate au niveau individuel. L'individu considéré est soit un organisme vivant, soit une fraction d'organisme vivant comme un organe ou même une cellule isolée. La définition de la survie varie selon le matériel vivant considéré : pour un organisme complexe, c'est la permanence des fonctions physiologiques essentielles ; pour une culture de tissu, la poursuite de la croissance ; pour un virus la conservation du pouvoir infectieux. Pour les bactéries, les organismes unicellulaires, les cellules en culture, isolées d'un organisme pluricellulaire, quelques auteurs prennent en considération des propriétés physiologiques telles que les qualités électives vis-à-vis de colorants ; mais dans la grande majorité des cas, les auteurs définissent la survie d'après le pouvoir de multiplication.

Selon ce dernier critère, le contraire de la survie est la perte du pouvoir de multiplication. Pour les cellules isolées, certains auteurs désignent ce phénomène sous le nom de mort cellulaire, dont ROBINSON (1965) a essayé de donner une définition rigoureuse. Dans ce travail, on a évité l'emploi du terme "mort" parce que la perte du pouvoir de multiplication n'est pas obligatoirement liée à l'arrêt des processus métaboliques.

La plupart des auteurs considèrent que la preuve de l'aptitude à la multiplication d'une cellule isolée est apportée quand la cellule a subi 6 divisions ou plus (NIAS et FOX, 1968) : quand ces divisions ont eu lieu, les cellules-filles obtenues peuvent être à l'origine de cultures successives, d'où le nom de survie infinie donné à ce type de survie.

Le taux de survie est la fréquence des survivants dans une population. On définit le taux de survie pour une dose D en établissant le rapport entre le nombre d'organismes qui ont survécu à l'irradiation et le nombre d'organismes qui auraient survécu en dehors de toute irradiation, les autres conditions restant identiques. Pratiquement, on se réfère à un témoin qui doit être un échantillon représentatif de la population étudiée.

Si l'on répète l'expérience pour diverses doses D, on peut tracer une courbe de survie en établissant une relation entre la dose de rayonnements absorbée par le matériel vivant et le taux de survie correspondant. En raison de l'étendue des valeurs des taux de survie considérés, on utilise généralement le logarithme des taux de survie. En pratique, on porte les résultats sur des coordonnées semi-logarithmiques (échelle arithmétique des doses en abscisses ; échelle logarithmique des taux de survie en ordonnées).

L'interprétation des courbes de survie nécessite la meilleure connaissance possible des conditions physiques de l'irradiation, mais aussi de l'état du matériel vivant et de son évolution au cours de l'irradiation.

2 – Intérêt des courbes de survie

Le pouvoir de multiplication est un caractère fondamental de tous les êtres vivants unicellulaires et pluricellulaires et de nombreuses cellules cultivées isolément après prélèvement sur les organismes pluricellulaires. Les courbes de survie traduisent donc un effet important des rayonnements. Elles sont susceptibles d'être adaptées aux résultats obtenus sur la plupart des organismes et par là de permettre la comparaison de la radiosensibilité de nombreuses espèces du monde vivant.

Les courbes de survie sont un bon moyen de comparer les effets de divers types de rayonnement (NEARY, SAVAGE, EVANS et WHITTLE, 1963 ; BARENDSEN, 1966), les conséquences de diverses méthodes d'irradiation (COHEN, 1968 ; HALL, 1962) et les influences de facteurs modifiant la réponse à l'irradiation (SOESTBERGEN, 1962 ; DEWEY, 1963 ; TILL, 1963 ; PIKE et ALPER, 1964).

Les enseignements que les courbes de survie apportent sont utilisés en radiostérilisation (BONET-MAURY, 1969), en radioprotection pour définir l'efficacité biologique relative des rayonnements (cf. les rapports de la Commission internationale de Radioprotection) et en radiothérapie (LIVERSAGE, 1966).

3 – Modèles mathématiques appliqués aux courbes de survie

On trouvera dans SINCLAIR (1966) et FOWLER (1966) une revue avec une bibliographie assez étendue des modèles mathématiques qui ont été appliqués aux courbes de survie. Ces modèles mathématiques se réfèrent à l'hypothèse selon laquelle il existe des sites sensibles (cibles) dans les cellules.

Des auteurs comme PAULY et RAJEWSKY (1963) étendent même cette théorie de la cible à des réactions qui demandent plusieurs étapes comme la consommation d'oxygène par des cellules irradiées. ORR, HOPE, WAKERLEY et STARK (1966), s'y réfèrent en partie dans une théorie dite métabolique de l'action des rayonnements.

L'existence d'un modèle probabiliste est justifiée par les faits essentiels suivants :

1) Les courbes expérimentales se rapprochent de courbes exponentielles. Il s'agit d'exponentielles pures pour la plupart des bactéries (BRUSTAD, 1964), des virus (DONINI et EPSTEIN, 1965), des levures (MAGNI, 1960), des cellules de mammifères lorsqu'elles sont

irradiées aux rayons alpha (BARENDSEN, 1964).

Il s'agit de courbes sigmoïdes pour quelques bactéries dans certains cas (BRUCE et MALCHMAN, 1965 ; VIZDALOVA et LISKA, 1966 ; DEWEY, 1964), de nombreuses levures (BACCHETTI et coll., 1966 ; BARSUKOV, MALINOVSKII, MITYUSHOVA, 1966) et la plupart des cellules de mammifères (par exemple, SINCLAIR, 1966 ; PUCK, 1965, qui a obtenu des courbes à partir d'expériences effectuées sur des cellules replacées chez un animal porteur). Elles se traduisent par des courbes à épaulement en coordonnées semi-logarithmiques (voir exemples donnés dans le chapitre III).

2) D'après les études effectuées sur des corps organiques comme l'acide désoxyribonucléique extrait de cellules, les effets directs et indirects de l'irradiation s'exerceraient au niveau de sites sensibles de la molécule (voir par exemple Radiation Research, suppl. 6, 1966).

3) Les études chromosomiques après irradiation (NEARY, 1965 ; NEARY et SAVAGE, 1966 ; REVELL, 1966) révèlent des cassures de chromatides ou de chromosomes. D'où l'idée que ces points de rupture matérialisent les sites sensibles (READ, 1965 et 1966).

Le travail de BIERMAN (1963) qui envisage la théorie de la cible dans sa plus large acception est un travail de base. Mais il faut citer le travail de DIENES (1966) qui présente un modèle cinétique de l'action des rayonnements sur la cellule.

4 – Essai de classification des modèles mathématiques relevés dans la bibliographie

Dès l'obtention des résultats, l'expérimentateur tente de tracer graphiquement les courbes de survie. C'est pourquoi les divers modèles mathématiques relevés dans la bibliographie seront classés ici selon la forme de la courbe qu'ils veulent traduire. Dans cet exposé, on désignera par S le taux de survie et par D la dose de rayonnements.

1. Courbes exponentielles

Hypothèse : une cible est détruite selon une loi linéaire par rapport à l'augmentation de dose.

Expression mathématique : $S = e^{-kD}$

Paramètre : un paramètre k qui traduit la radiosensibilité de la cible. Il représente la pente de l'exponentielle tracée en coordonnées semi-logarithmiques. On le fait souvent apparaître sous la forme $\frac{I}{D_o}$:

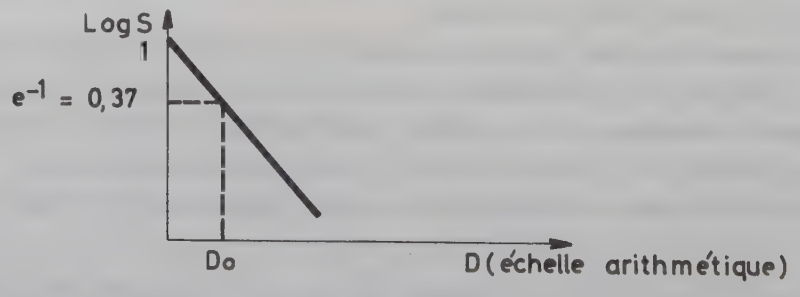


Figure I.1

2. Courbes sigmoïdes

c'est-à-dire courbes à épaulement en coordonnées semi-logarithmiques

a. Courbes dont la tangente à l'origine est parallèle à l'axe des doses

* Courbes ayant pour asymptote une courbe exponentielle pure :

Hypothèse : on suppose que chaque unité dont on étudie la survie comporte plusieurs cibles inactivées selon l'hypothèse des courbes exponentielles et qu'il faut inactiver toutes les cibles pour inactiver l'unité.

Expression mathématique : $S = 1 - (1 - e^{-\frac{D}{Do}})^n$

Paramètres : Do dépend de la pente de la courbe asymptote et traduit la radiosensibilité d'une cible. n, appelé nombre d'extrapolation, qui est la valeur de l'ordonnée de l'asymptote pour D = 0, représente le nombre de cibles qui doivent être inactivées pour qu'il y ait inactivation de l'unité.

C'est l'interprétation la plus couramment utilisée.

** Courbes sans asymptote dont la pente de la tangente croît quand D augmente.

Hypothèse : chaque unité comporte une cible unique inactivée par plusieurs événements de même probabilité.

Expression mathématique : dans le cas de m événements :

$$S = e^{-kD} \sum_{i=0}^{i=m-1} \frac{(kD)^i}{i!}$$

Paramètres : k représente la probabilité pour un événement de survenir. Il existe un deuxième paramètre qui est le nombre m d'événements nécessaires pour inactiver une même cible.

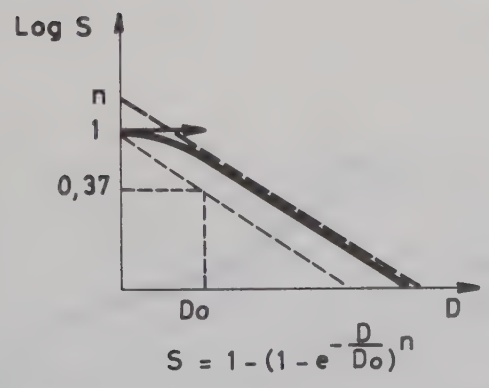


Fig. I.2

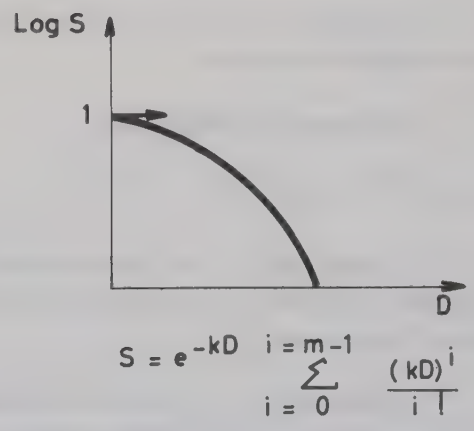


Fig. I.3

b) Courbes dont la tangente à l'origine n'est pas parallèle à l'axe des doses

Hypothèse 1. Au processus de la théorie multicible, s'ajoute un autre phénomène exponentiel. Quand la dose augmente, on tend très vite vers un produit d'exponentielles comme dans l'hypothèse 2.

Expression mathématique :

$$S = e^{-\mu D} \left[1 - \left(1 - e^{-\frac{D}{Do}}\right)^n \right]$$

Paramètres : on retrouve les paramètres Do et n des courbes définies au paragraphe a, μ étant le paramètre d'un autre type d'arrêt de la multiplication cellulaire résultant d'un processus à un coup comme pour les courbes exposées au paragraphe 1.

Bibliographie : PORTER (1963), BENDER, GOOCH (1962), OLIVER (1964), NEARY (1965).

Hypothèse 2 : Processus à plusieurs étapes dont une, métabolique, peut être le siège d'une restauration.

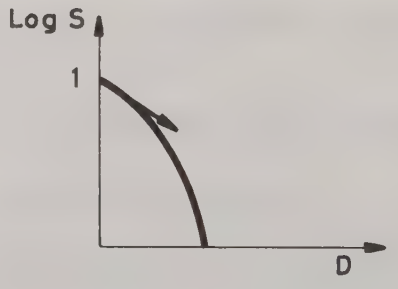


Fig. I.4

Expression mathématique :

$$S = e^{-(k_1 D + k_2)D}$$

Paramètres : deux paramètres k_1 et k_2 dont ORR et coll. (1966) ne donnent pas d'interprétations biologiques.

Bibliographie : BARENDSEN, WALTER (1964), ORR, HOPE, WAKERLEY, STARK (1966).

3 – Courbes présentant deux parties distinctes

Hypothèse : Il y aurait deux populations de caractéristiques distinctes.

Expression mathématique :

$$S = k_1 e^{-k_2 D} + k_3 e^{-k_4 D}$$

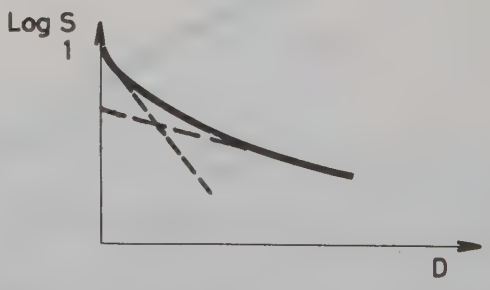


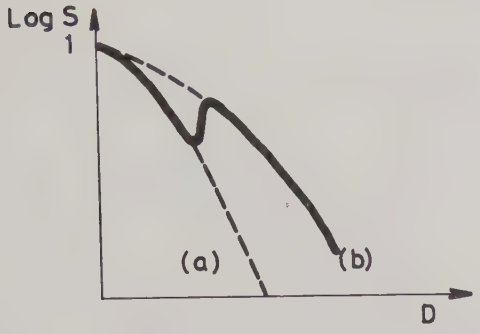
Fig. I.5

Paramètres : Les paramètres de chaque courbe exponentielle sont les mêmes que pour la courbe présentée au paragraphe 1.

Bibliographie : PALACIOS et coll. (1963), ARCHAMBEAU, DREW et ROBERTSON (1964).

On peut rapprocher de cette formule celle de HAYNES (1964) qui propose $S = e^{(-kD + \alpha (1 - \exp(-\beta D)))}$.

Il faut aussi rattacher à ce paragraphe les courbes composites telles que celles que CALKINS (1967) a signalées pour le protozoaire Tetrahymena. Dans ce cas, l'organisme réagit à deux courbes de survie d'épaulement différent, dont chacun, d'après CALKINS, traduit la possibilité de restauration d'une catégorie de dégâts.



a) Courbe théorique due au système N,

b) " " " " T,

en trait plein, courbe réelle.

Fig. I.6

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

A - LE MATERIEL VIVANT

1 - Souche utilisée

Chlorella pyrenoidosa Chick est une algue chlorophycée unicellulaire de l'ordre des Chlorococcales ; c'est un eucaryote. Nous utilisons une souche EMERSON qui nous a été aimablement fournie par le laboratoire de Photosynthèse du Centre National de la Recherche Scientifique à GIF-sur-YVETTE.

En raison des conditions de culture utilisées et des repiquages successifs - repiquages de clones en nombre limité pour purifier la souche de tout champignon et de toute bactérie, puis repiquages mensuels ou bimestriels de conservation durant dix ans - la souche actuelle n'a peut-être plus exactement les mêmes caractères que la souche à l'origine.

Chlorella pyrenoidosa a une forme légèrement ovoïde. Cette algue ne présente pas de multiplication sexuée : toute cellule qui se divise est à l'origine d'un clone. Sur milieu gélifié, chaque colonie qui provient d'une seule cellule représente un clone.

Le développement de Chlorella pyrenoidosa est très voisin de celui de Chlorella ellipsoidea étudié par MURAKAMI, MORIMURA et TAKAMIYA (1963) (fig. II.1), comme le montre l'étude au microscope électronique effectuée sur des algues de nos cultures synchronisées (fig. II.2). Le cycle cellulaire s'étend de la libération de l'autospore jusqu'à la libération des autospores filles.

Les études cytologiques par microscopie électronique ont montré que la division du noyau a lieu à l'intérieur de la membrane nucléaire et qu'elle est extrêmement fugace. C'est pourquoi la microscopie électronique ne permet pas de définir le début de la - ou des - phase M et donc de reconnaître une - ou plusieurs - phase G2 dont l'existence a été niée par WANKA (1965).

Par marquage au ^{32}P (les algues en autotrophie incorporant mal les précurseurs spécifiques des acides nucléiques) DALMON (1969-1970) a étudié le métabolisme des divers acides désoxyribonucléiques (ADN) de la souche utilisée pour ce travail, avec des cultures synchronisées décrites plus loin.

Ce métabolisme est résumé dans la figure II.3 qui regroupe des résultats obtenus pour des populations cellulaires synchronisées. La synchronisation n'étant pas parfaite, nous ne savons pas si la synthèse de chaque ADN dans une cellule a lieu en une seule ou plusieurs fois au cours du cycle cellulaire. Chaque division du chloroplaste et du

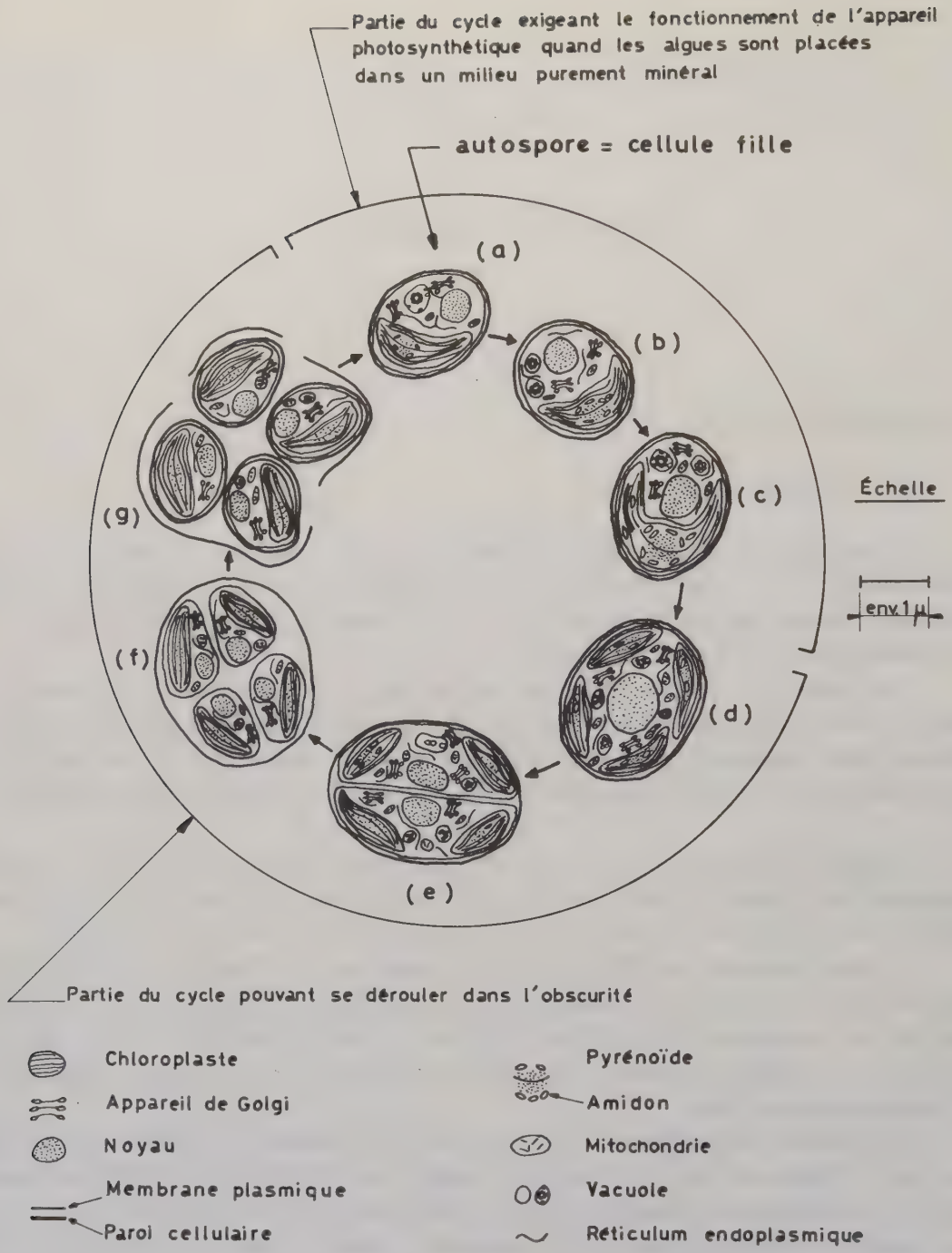


Fig. II.1 – Diagramme illustrant le cycle cellulaire de Chlorella ellipsoidea, d'après MURAKAMI, MORIMURA, TAKAMIYA (1963).

Fig. II.2 – Montage de photographies illustrant le cycle cellulaire de Chlorella pyrenoidosa.

Une correspondance approximative entre la figure II, 1 et les photographies est notée au moyen des lettres a, b, c, e et f.

noyau pourrait être précédée de la synthèse de l'ADN correspondant. Il peut exister plusieurs stades G_2 et des stades G_1 intermédiaires. Pour une cellule donnée, la durée des synthèses des ADN peut être brève ; elle est certainement inférieure à celle qui est mesurée sur une population considérée dans son ensemble.

Chez la plupart des eucaryotes, le cycle cellulaire, qui s'étend du début du développement à la séparation des cellules-filles, comprend une seule phase G_1, une phase S, une seule phase G_2 et une seule phase M. Chez les Chlorelles, le cycle cellulaire n'est pas équivalent à celui des autres cellules. Mais il ne comprend qu'une seule phase d'accumulation de réserves où la photosynthèse est nécessaire quand les algues sont cultivées en milieu purement minéral.

La figure II.3 définit, pour une population synchronisée, les durées de G_1 et de S et met en évidence l'existence d'un cycle métabolique de l'ADN du chloroplaste, identique à celui du noyau mais décalé dans le temps par rapport à celui-ci, de même que la division du chloroplaste est décalée dans le temps par rapport à la division du noyau (DALMON, 1970).

Un caractère important des Chlorelles est l'existence d'une membrane complexe, constituée principalement de cellulose, d'hémicellulose et de composés pectiques. Cette membrane augmente les difficultés d'extraction de certaines substances. Les variations de pression obtenues dans un RIBI CELL FRACTIONATOR (SORVALL) permettent de briser cette membrane mais entraînent la rupture des membranes de la plupart des organites cellulaires. Par contre, la membrane confère une forme bien définie aux cellules, ce qui facilite l'emploi d'un compteur électronique de particules, en vue de tracer les diagrammes des tailles des cellules d'une population de Chlorelles ; de plus, cette membrane limite l'adhérence des algues aux parois des récipients, ce qui permet la culture en suspension liquide avec une agitation modérée.

Le volume des Chlorelles est généralement rapporté au diamètre de la sphère du volume équivalent. Il présente des variations importantes au cours du cycle cellulaire. Dans les conditions où sont maintenues nos cultures, le volume minimum des autospores est de 4 μ^3 (diamètre 2μ) ; les amas d'autospores lors de l'éclatement de la cellule-mère peuvent atteindre 500 μ^3 (diamètre 10 μ) ; les cellules peuvent se diviser dès qu'elles atteignent un volume de 35 μ^3 (diamètre 4 μ).

2 - Milieu de culture

Les milieux de culture pour Chlorelles sont nombreux. Aucun n'est défini d'une manière entièrement rationnelle : des neuf milieux étudiés, le milieu voisin de celui de TAMIYA et publié par MOYSE (1956) a fourni les cultures liquides les plus denses à leur plateau de croissance.

Au milieu "MOYSE", nous ajoutons du nitrate de calcium pour tenir compte des résultats de WALKER (1953) bien que HOPKINS et WANN, cités par KRAUSS dans BURLEW (1953) aient affirmé que les traces de calcium introduites par les autres produits suffisaient au développement des Chlorelles. Nous avons déterminé la concentration en nitrate de calcium pour rester en dessous du seuil de précipitation du phosphate calcique. Il en résulte le milieu défini dans le tableau II.1.

On a utilisé le même milieu gélifié par 20 gl^{-1} de bacto-agar DIFCO qui apporte des oligoéléments avec les chaînes carbonées qui le composent. Les Chlorelles ne dégradent pas l'agar-agar.

Les solutions-mères de macroéléments sont mélangées, diluées au moment de

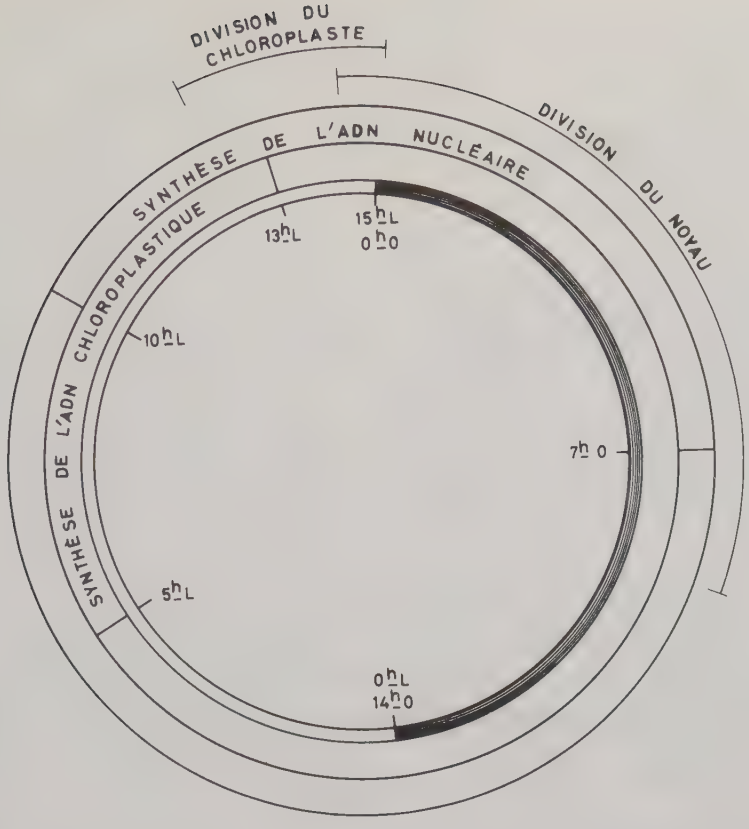


Figure II.3 : Métabolisme des ADN au cours du cycle cellulaire d'une population de Chlorelles synchronisée.

L = lumière ; 0 = obscurité.

l'emploi du milieu, après addition de 1 cm^3 des solutions-mères de A_4 et B_7 par litre de milieu ; pH du milieu 4,3.

3 - Cultures souches

Elles ont lieu sur milieu gélifié en tubes de culture, bouchés au coton, placés dans une pièce thermorégulée à 22°C ± 1°C sous un éclairage délivré 12 heures par jour par des tubes fluorescents PHILIPS blanc brillant de luxe (éclairement de 2000 lux, mais le luxmètre est un appareil accordé à la sensibilité de l'oeil humain et non aux longueurs d'onde utiles aux algues).

Les algues sont repiquées chaque mois ou tous les deux mois. Au départ, la souche a été purifiée des bactéries et des champignons adhérant à la coque des Chlorelles. Cette opération a été effectuée par dilution et par le choix, à l'aide du micromanipulateur, de cellules axéniques. Les quelques dizaines de clones axéniques ainsi obtenus ont été mêlés par la suite.

Les études que nous avons effectuées, leur comparaison avec les données bibliographiques, autorisent à penser que l'isolement d'un nombre restreint de clones au départ et les repiquages successifs n'ont pas conduit à une évolution de la souche par sélection inconsciente.

TABLEAU II.1

Milieu "MOYSE"

	Sels utilisés	Concentration en $g.l^{-1}$	Concentration en $mole.l^{-1}$	Concentration en $g.l^{-1}$ des solutions mères
Macroéléments	KNO_3	5	$4,9.10^{-2}$	100
	$MgSO_4$, 7 H_2O	2,5	$1,01.10^{-2}$	100
	KPO_4H_2	1,25	$9,2.10^{-3}$	50
	$C_{10}H_{10}N_2O_8NaFe$, 3 H_2O = EDTA ferrique	0,0044	$1,04.10^{-5}$	0,88
	$Ca(NO_3)_2$, 4 H_2O	0,03	$1,27.10^{-4}$	10
Oligoéléments Solution A_4 d'ARNON	H_3BO_3	$2,86.10^{-3}$	$4,63.10^{-5}$	Solution concentrée 10^3 fois
	$MnSO_4$, H_2O	$1,55.10^{-3}$	$9,17.10^{-6}$	
	$ZnSO_4$, 7 H_2O	$0,22.10^{-3}$	$7,65.10^{-7}$	
	$CuSO_4$, 5 H_2O	$0,079.10^{-3}$	$3,16.10^{-7}$	
Oligoéléments Solution B_7 d'ARNON	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 4 H_2O	1288.10^{-7}	$1,04.10^{-7}$	Solution concentrée 10^3 fois
	NH_4VO_3	$229,6.10^{-7}$	$1,96.10^{-7}$	
	$CrK(SO_4)_2$, 12 H_2O	960.10^{-7}	$1,9.10^{-7}$	
	$NiSO_4$, 7 H_2O	$478,5.10^{-7}$	$1,7.10^{-7}$	
	$Co(NO_3)_2$, 6 H_2O	$493,8.10^{-7}$	$1,7.10^{-7}$	
	Na_2WO_4, 2 H_2O	$179,4.10^{-7}$	$5,4.10^{-8}$	
	$TiOSO_4$, 4 H_2O	$241,64.10^{-7}$	$1,04.10^{-7}$	

* La solution B_7 est préparée dans une solution H_2SO_4 $\frac{N}{10}$

4 - Cultures réalisées

a) Contrôle des cultures : l'état des cellules peut être jugé rapidement par l'observation au microscope optique : les cellules, en bon état physiologique, ont un chloroplaste bien développé et bien coloré ; les autospores sont visibles à l'intérieur des cellules-mères.

Toute étude cytologique plus fine exige l'emploi du microscope électronique, mais l'observation n'a lieu que plusieurs jours après la fixation du matériel vivant ; comme les coupes sont extrêmement minces (200 Å) et ne peuvent pas être sériées, seule une étude statistique des images donne l'état cytologique d'une population.

L'axénie des populations de Chlorelles (c'est-à-dire l'absence d'organismes étrangers dans les cultures) est contrôlée grossièrement par l'observation au microscope

optique, plus finement par ensemencement soit sur des milieux propres à la croissance de chaque type de ces hétérotrophes, soit sur des milieux polyvalents comme le milieu de haricot. Toutes les cultures utilisées étaient axéniques.

Les cultures sont caractérisées principalement par leur densité cellulaire, le diagramme des tailles des cellules, le taux de clonage. Le taux de clonage correspond à la "plating efficiency" des auteurs de langue anglaise : il représente le rapport entre le nombre de clones qui apparaissent et le nombre de cellules ensemencées sur milieu gélifié. Dans les conditions auxquelles sont soumises les cultures, les clones sont visibles à l'oeil nu sept jours après l'ensemencement.

La densité cellulaire et le diagramme des tailles des cellules ont été établis parfois au microscope optique, systématiquement avec un compteur électronique de particules.

Récemment, GROVER et coll. (1969) ont publié une théorie du fonctionnement et une étude pratique du compteur électronique COULTER que nous utilisons, et qui a déjà été employé pour l'étude des algues unicellulaires par MALONEY, DONOVAN et ROBINSON (1961) ; JAMES et ANDERSON (1963) ; EL-SAYED et LEE (1963) ; ZELLNER, GUSTIN, BUCK et MAYERS (1963) ; SHIBATA, MORIMURA et TAMIYA (1964). Ici, le compteur COULTER a été utilisé de la façon suivante :

- sonde du commerce avec un orifice de 70 μ de diamètre, de 40 μ de longueur environ ; d'après GROVER et coll. (1969) un rapport tel entre la longueur et le diamètre de l'orifice conduit à sous-estimer de 15 % les volumes de certaines particules selon la façon dont ces dernières pénètrent dans le champ électrique autour de l'orifice ;

- milieu de dilution : solution des macroéléments du milieu de culture. Avant emploi, le milieu de culture est filtré sur filtre d'acétate de cellulose à seuil d'arrêt de 0,4 μ. On a abandonné l'utilisation d'une solution de NaCl de même pression osmotique que le milieu de culture, car cette solution provoquait une contraction des algues par déséquilibre ionique ;

- étalonnage avec des billes de latex de 2,05 et 2,956 μ de diamètre moyen ; on trace un diagramme des tailles avec des classes très fines d'une suspension de ces billes dans le milieu de dilution (10.000 particules par 0,5 ml environ) et l'on recherche le réglage qui correspond au mode de la courbe obtenue ;

- définition des classes de volume par le diamètre de la sphère de volume équivalent ; les classes les plus utiles pour suivre l'évolution des cultures synchronisées sont celles qui sont caractérisées par les diamètres (en μ) suivants :

2 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 4,25 ; 4,50 ; 5 ; 6 et au-delà qui correspondent à des volumes (en μ^3) de :

4,2 ; 14,1 ; 22,5 ; 33,5 ; 40,2 ; 47,7 ; 65,5 ; 113,1 et au-delà.

Par sa précision et sa rapidité, le compteur électronique de particules a rendu possible une méthode de synchronisation des Chlorelles basée sur l'évolution de la population qui doit être synchronisée (voir plus loin "cultures synchronisées"). En effet, la précision est de l'ordre de 0,4 μ^3 sur le volume des particules (soit 0,03 μ pour une sphère de 3 μ de diamètre), mais peut-être en sous-estimant les volumes de certaines particules de 15 % ; la précision est de 2 à 3 % sur le nombre de cellules de chaque classe quand on atteint 1000 particules par classe dans 0,5 ml. En huit minutes, on peut effectuer les mesures

nécessaires pour établir un diagramme de tailles d'une population de Chlorelles.

b) Types de cultures :

Cultures sur milieu nutritif gélifié : Les cultures souches ensemencées en tube avec une anse n'évoluent plus après deux semaines mais gardent plusieurs mois des cellules capables de se multiplier dès la remise en culture. Ces cellules sont donc dans un état quiescent qu'on peut appeler l'état Go (fig. II.4 a).

Le dénombrement des cellules capables de donner une colonie (qui, dans ce cas, est un clone) s'opère à partir d'ensemencements de suspensions de Chlorelles en boîtes de Pétri : la suspension de densité convenable est déposée sous forme de gouttes sur une membrane d'acétate de cellulose placée sur le milieu gélifié coulé dans la boîte. Pour les algues non irradiées, toutes les colonies sont visibles à l'oeil nu sept jours après l'ensemencement, dans les conditions suivantes : boîtes de Pétri maintenues à 22°C, éclairement continu sur chacune des deux faces de la boîte de Pétri par des tubes fluorescents PHILIPS blanc brillant de luxe (2000 lux sur chaque face) ; humidité relative de l'air 55 %. Quand les gouttes sont déposées directement sur le milieu gélifié, il faut 12 heures pour qu'elles soient absorbées ou évaporées, dans les conditions où sont placées nos cultures. L'utilisation d'une membrane d'acétate de cellulose ayant des pores de 0,4 μ environ (ENGLAND, 1969, et FRIEDMAN et coll., 1968, ont étudié la forme et la taille de ces pores au microscope électronique) assure l'étalement des gouttes ensemencées et ramène à 2 heures la durée de leur absorption ; on améliore ainsi la précision des dénombrements en limitant l'importance des phénomènes suivants :

- coalescence des cellules vers le centre de la goutte lors de l'évaporation ;
- séparation des cellules-filles issues d'une même cellule-mère qui pourraient alors être à l'origine de clones distincts.

Le tableau II-2 illustre l'intérêt d'utiliser des membranes d'acétate de cellulose.

TABLEAU II-2

Numéro d'ordre des suspensions ensemencées	N_1	N_2	$\frac{N_1}{N_2} \times 100$
1	458	678	67,5
2	457	675	67,8
3	788	1101	71,6
4	1179	2468	47,8
5	1782	2682	66,4
6	2511	4066	61,8

N_1 : nombre de colonies obtenues par ensemencement de 1 ml d'un échantillon directement sur milieu gélifié ;

N_2 : nombre de colonies obtenues par ensemencement de 1 ml du même échantillon sur membrane d'acétate de cellulose déposée sur milieu gélifié.

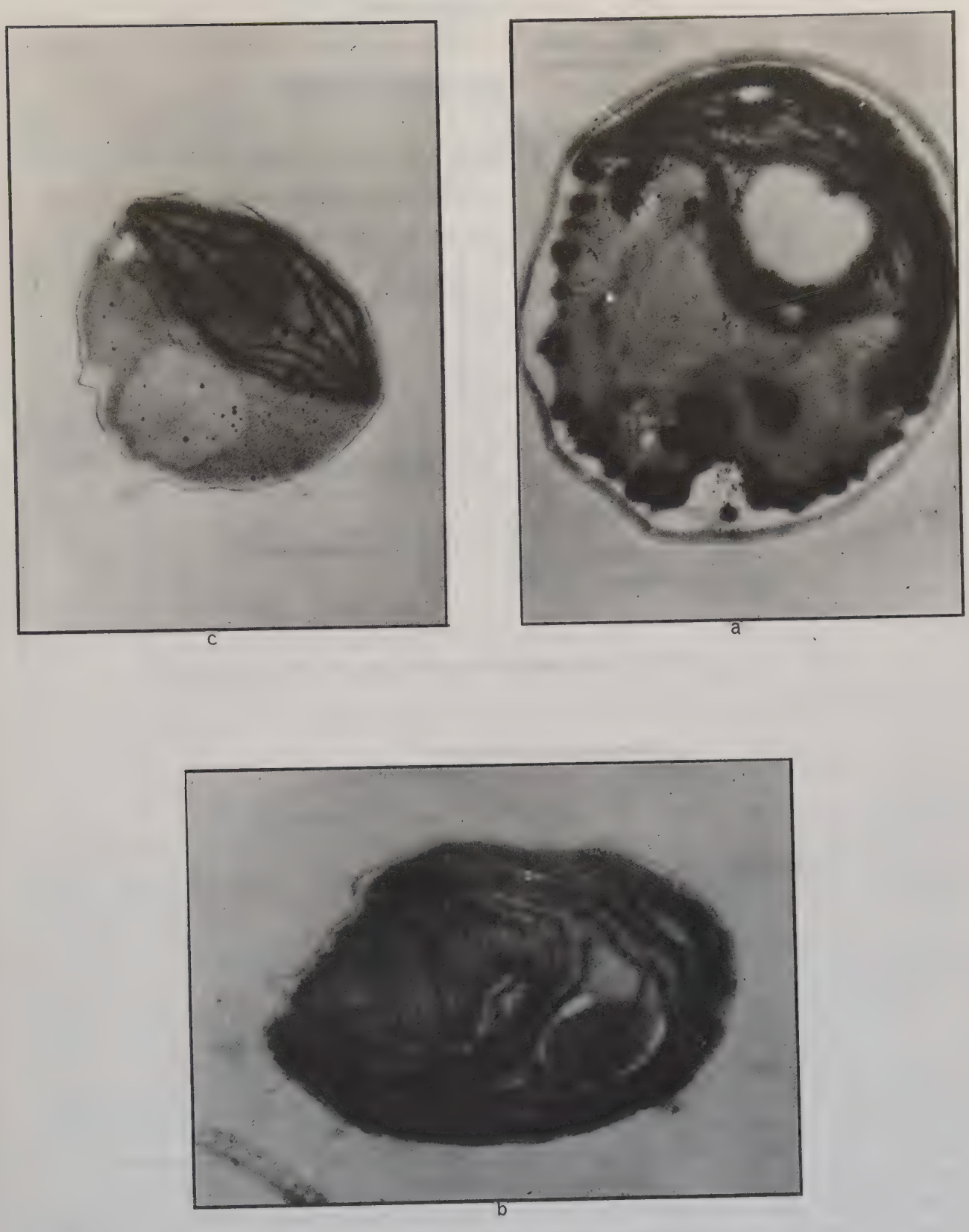


Fig. II.4 – Coupes de Chlorelles provenant de divers types de culture :
a) cellule en Go sur milieu gélifié ;
b) cellule de 4 μ^3 d'une culture en masse au début du plateau de croissance ;
c) autospore obtenue en culture synchronisée.

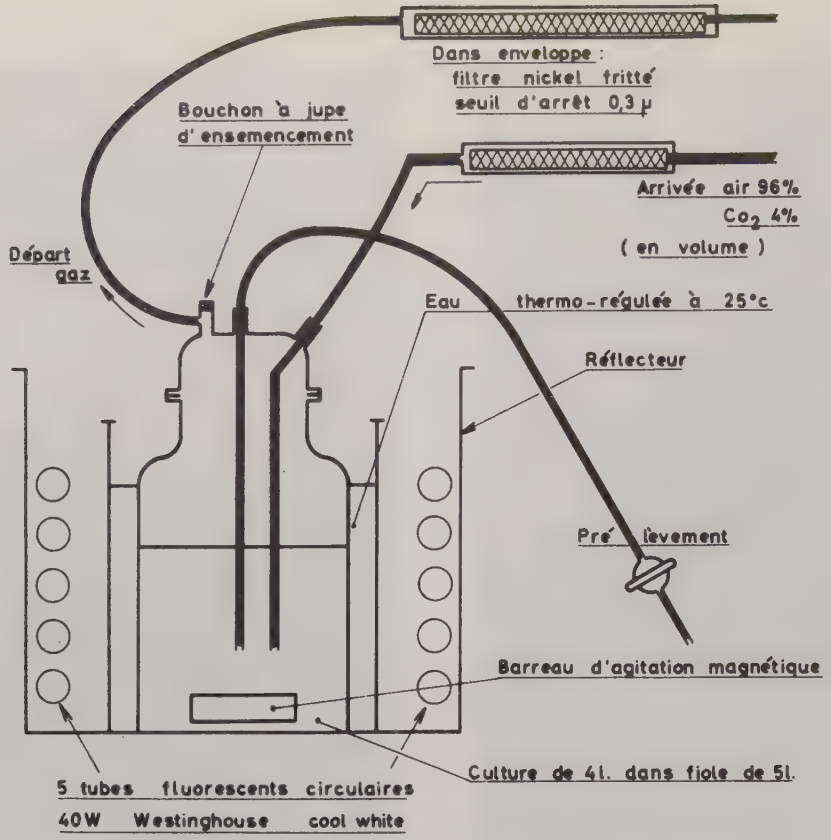


Fig. II.5 - Schéma du dispositif de culture en masse (échelle 1/4).

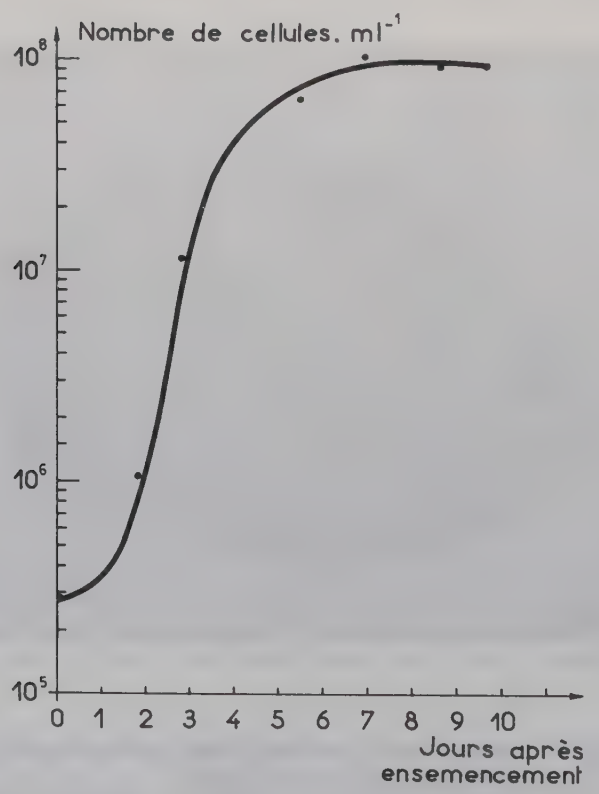


Fig. II.6 - Croissance d'une culture en masse.

Avec les membranes d'acétate de cellulose, on peut estimer à 10 % l'écart maximum entre des dénombrements de colonies provenant d'une même suspension.

Cultures denses en milieu liquide : il s'agit de cultures denses en milieu limité, appelées ici cultures en masse. Elles sont représentées dans la figure II.5 et leur croissance est illustrée par la figure II.6 et le tableau II.3.

TABLEAU II-3

Evolution de deux cultures en masse cultivées dans les conditions les plus voisines possibles

Age en jours	Culture I		Culture II		pH
	Nbre total cell/ml	Vol. moyen d'une cell.	Nbre total cell/ml	Vol. moyen d'une cell.	
5	24.10^6	26,947 μ^3	$30,428.10^6$	27,3334 μ^3	6,5
7	$138,175.10^6$	15,5593 μ^3	$136,81 .10^6$	18,4577 μ^3	6,7
9	$184,83 .10^6$	16,1449 μ^3	$159,39 .10^6$	18,7446 μ^3	6,85
12	$195,93 .10^6$	18,2034 μ^3	$166,29 .10^6$	19,9308 μ^3	7
14	$175,34 .10^6$	19,884 μ^3	$153,08 .10^6$	22,0639 μ^3	7,1

Au 7e jour après l'ensemencement, la culture atteint le plateau de croissance avec une densité allant de 100 à 250.10^6 cellules par millilitre. Au sein de la culture, les cellules sont à l'obscurité et l'agitation électromagnétique, en les faisant passer près des parois, les soumet de brefs instants à l'énergie lumineuse. Cette population est composée de petites cellules ayant l'aspect cytologique illustré par la figure II.4 b.

Cet aspect est très voisin de celui des cellules au stade Go en culture souche, avec une membrane moins épaisse et moins de réserves de lipides à la périphérie de la cellule. Il s'agit d'un état de repos Go. Selon DALMON (communication personnelle) la quantité d'ADN par cellule est de 40.10^{-9} μg.

A partir du 7e jour, le diagramme cellulaire de la population évolue plus lentement (fig. II.7).

Le pH des cultures varie en fonction de la densité cellulaire et passe de 4,3 à l'ensemencement à 7,2 lorsqu'on atteint le plateau de croissance.

Dans ces cultures, le facteur limitant est bien la lumière et non l'épuisement d'un sel : le milieu d'une culture à son plateau de croissance, débarrassé par centrifugation à 8300 g des algues et des débris cellulaires, stérilisé à froid sur filtre d'acétate de cellulose, garde un pH de 7,2 et assure le développement d'une nouvelle culture qui atteint, dans les mêmes délais, la même densité cellulaire que la culture initiale.

Dans ces cultures, au plateau de croissance, se trouvent des coques vides de

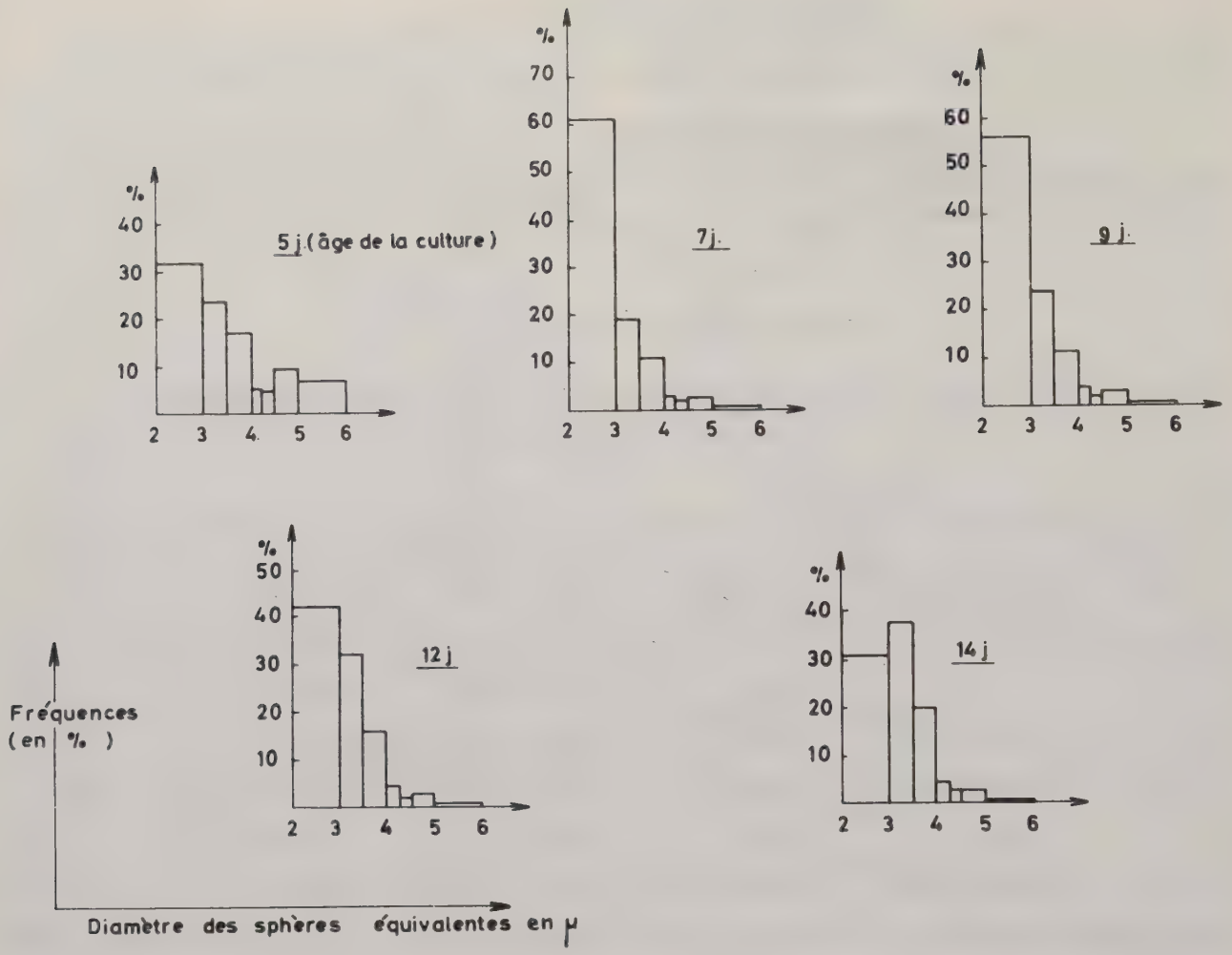


Figure II.7 : Evolution des diagrammes de tailles cellulaires pour une population de Chlorelles en culture de masse.

cellules mortes dénombrées au compteur électronique de particules et des cellules qui ont perdu leur pouvoir de multiplication. C'est ce qui explique que le taux de clonage puisse varier au cours du temps dans une même culture et d'une culture à l'autre. Pour 31 cultures, sa valeur moyenne est de 87,2, avec un écart-type de 1,04 et des valeurs extrêmes de 62 à 105.

Cultures synchronisées : On désigne ainsi les cultures dont les populations sont synchronisées c'est-à-dire dont, en principe, à tout moment, les cellules sont au même stade de leur cycle cellulaire qu'elles parcourent toutes de la même façon. Elles ont été décrites par DALMON et GILET (1969).

Nous réalisons des cultures synchronisées d'un volume allant de 1 à 18 litres avec une densité cellulaire de 2 à 10.10^9 cellules par litre (2 à 10.10^6 cellules par millilitre). Le facteur d'inhibition d'un stade cellulaire est l'obscurité : dans un milieu purement minéral, les autospores libérées ne peuvent parcourir leur cycle que si elles disposent d'énergie lumineuse.

On ensemence la culture à synchroniser avec une population de cellules en Go provenant d'une culture liquide dense à son plateau de croissance, de façon à réaliser une densité de 2.10^6 cellules par millilitre. On interrompt la lumière lorsque 80 % des cellules

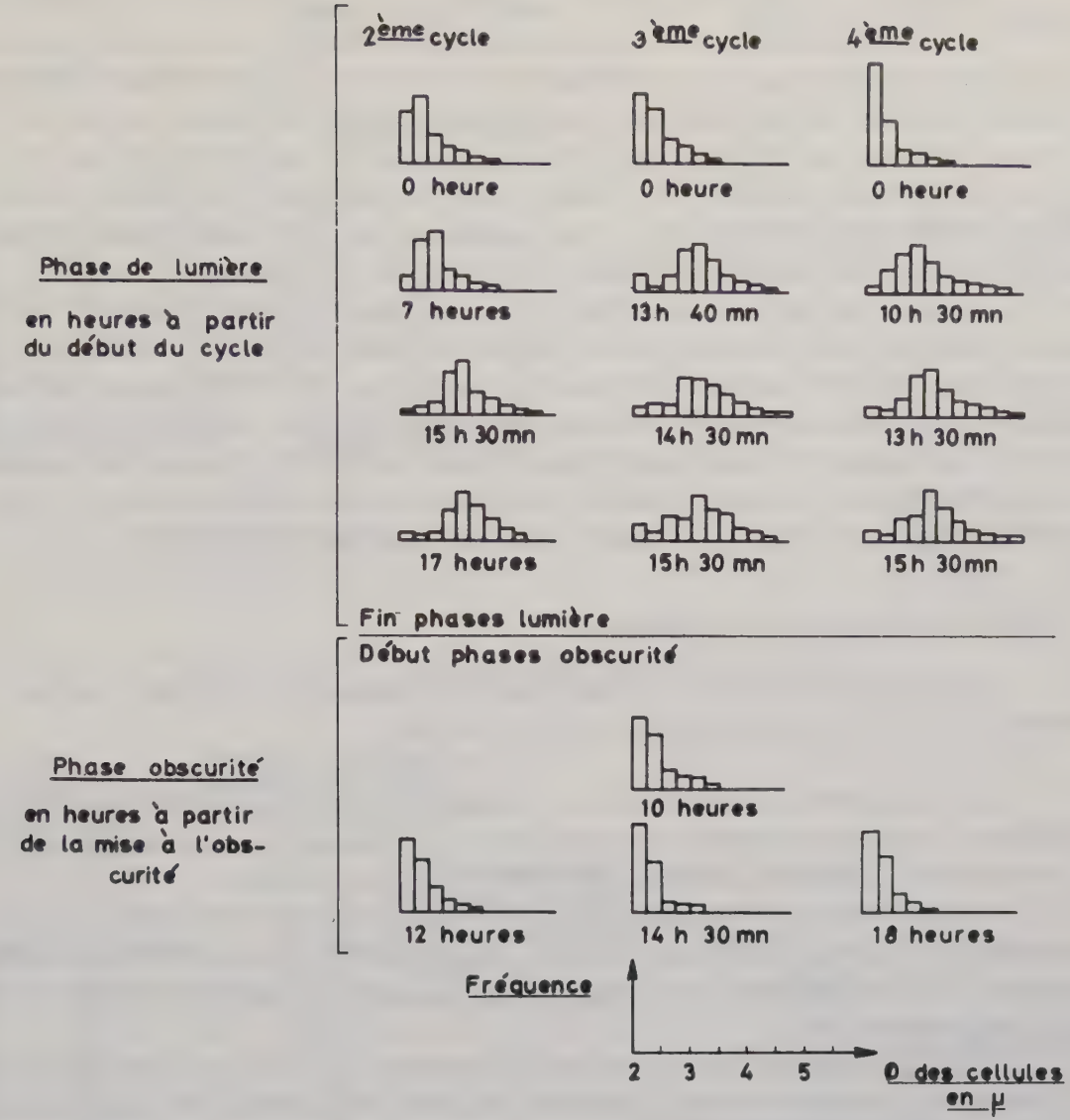


Fig. II.8 : Evolution des diagrammes de tailles des cellules d'une population synchrone au cours de 3 cycles successifs.
Les classes utilisées ici correspondent à des diamètres de (en μ) 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5 et 6 pour illustrer l'évolution des populations d'une manière fine.

atteignent un volume supérieur à 35 μ^3. Lorsque toutes les autospores sont libérées, on effectue la dilution avec du milieu neuf qui amène à la densité cellulaire choisie entre 2 et 10.10^6 cellules par millilitre et en éclairant de nouveau, on assure le déroulement d'un deuxième cycle (fig. II.8).

On opère de la même façon pour les cycles suivants.

A partir du deuxième cycle, la durée de la phase d'éclairement est de 15 à 16 heures. La libération des autospores a lieu entre la 6e et la 9e heure d'obscurité. L'obscurité peut être prolongée jusqu'à 24 heures sans perturber le cycle suivant ; on s'appuie sur ce fait pour obtenir au moment voulu une population de Chlorelles dans l'état recherché. Si l'obscurité dépasse 24 heures, on doit prolonger la phase d'éclairement du

cycle suivant.

En raison de leur faible densité cellulaire et des dilutions à chaque cycle, les cultures synchronisées restent toujours à un pH de 4,3.

Le premier cycle porte sur des cellules provenant de cultures où les conditions d'éclairement et de pH sont très différentes de celles où se trouvent les cultures synchronisées. C'est ce qui peut expliquer que le premier cycle soit plus long que les cycles suivants. Souvent, au premier cycle, on n'atteint pas un taux de 80 % pour les cellules d'un volume supérieur à 35 μ^3 ; dans ce cas, on maintient l'éclairement jusqu'à la libération des premières cellules-filles. Au premier cycle, l'éclairement dure de 24 à 26 heures et il est bon de prolonger l'obscurité au-delà de 14 heures.

A chaque cycle, les autospores libérées et maintenues à l'obscurité vivent en utilisant leurs réserves d'amidon. On peut parler d'un état de repos G'o pour le distinguer de l'état Go défini pour les cultures en tube et les cultures en masse. En effet (fig. II.4c), les jeunes autospores ont une membrane plus mince que celle des cellules Go et surtout leur chloroplaste n'occupe que la moitié de la cellule, avec moins de lamelles. De plus, les inclusions de réserves seraient un peu plus importantes chez G'o que chez Go. DALMON (1970) estime à 40.10^{-9} μg la quantité d'ADN par autospore.

B - MOYENS D'IRRADIATION UTILISES

Cette étude repose sur des expériences d'irradiation effectuées avec les rayonnements γ du ^{60}Co et des rayons X de 250 à 310 kVp.

1 - Irradiations aux rayons γ : les figures II.9 a et b représentent le dispositif porte-source en acier inoxydable, les récipients d'irradiation en verre pyrex, la nacelle en nylon qui assure la mise en irradiation des récipients d'irradiation.

La décroissance de la radioactivité du Cobalt 60 étant parfaitement connue, la reproductibilité des doses ne dépend que de la reproductibilité des conditions géométriques de l'irradiateur et de la précision de la durée pendant laquelle le matériel à irradier est exposé aux rayonnements.

La reproductibilité des conditions géométriques est assurée au millimètre près pour des dimensions de l'ordre d'une ou plusieurs dizaines de centimètres selon la position des sources pour tout le montage, sauf pour les récipients d'irradiation en pyrex qui ont des cotes moins rigoureuses que les autres éléments. Cependant, la reproductibilité des doses d'un récipient à l'autre est de l'ordre des erreurs de la dosimétrie.

Pour assurer l'homogénéité des doses dans la suspension irradiée, ou bien on agite cette cette suspension par barbotage d'un mélange gazeux, ou bien on irradie le volume le plus faible possible (ici 5 ml).

La protection de l'expérimentateur est réalisée par une épaisseur d'eau de 3,2 mètres que la nacelle doit traverser dans le tube d'irradiation pour venir en contact avec les butées d'arrêt ; cette nacelle en nylon porte, à sa partie inférieure, un aimant cylindrique dont le champ magnétique ferme un interrupteur magnétique au moment où la nacelle touche les butées. L'interrupteur commande un chronomètre au 1/5 de seconde qui s'arrête dès que la nacelle quitte les butées. L'erreur de doses provient donc de l'irradiation subie par l'échantillon lors du parcours de la nacelle dans le tube d'irradiation.

Le pouvoir d'arrêt $\frac{\mu}{\rho}$ de l'eau vis-à-vis des rayons γ du Cobalt 60 (d'énergie environ 1,3 MeV) est de 0,063 $cm^2.g^{-1}$. Donc à 76 cm des sources, la dose reçue par

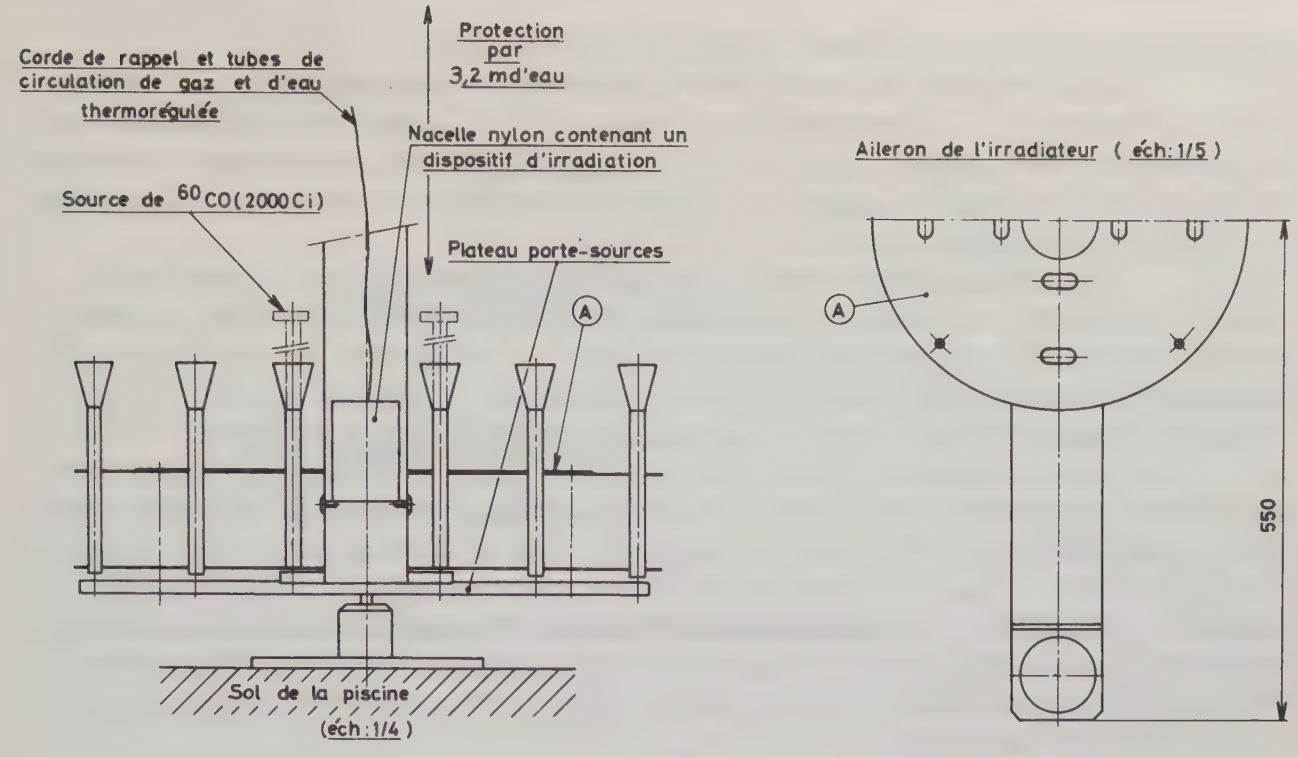


Fig. II.9 a – Dispositif d'irradiation aux rayons γ

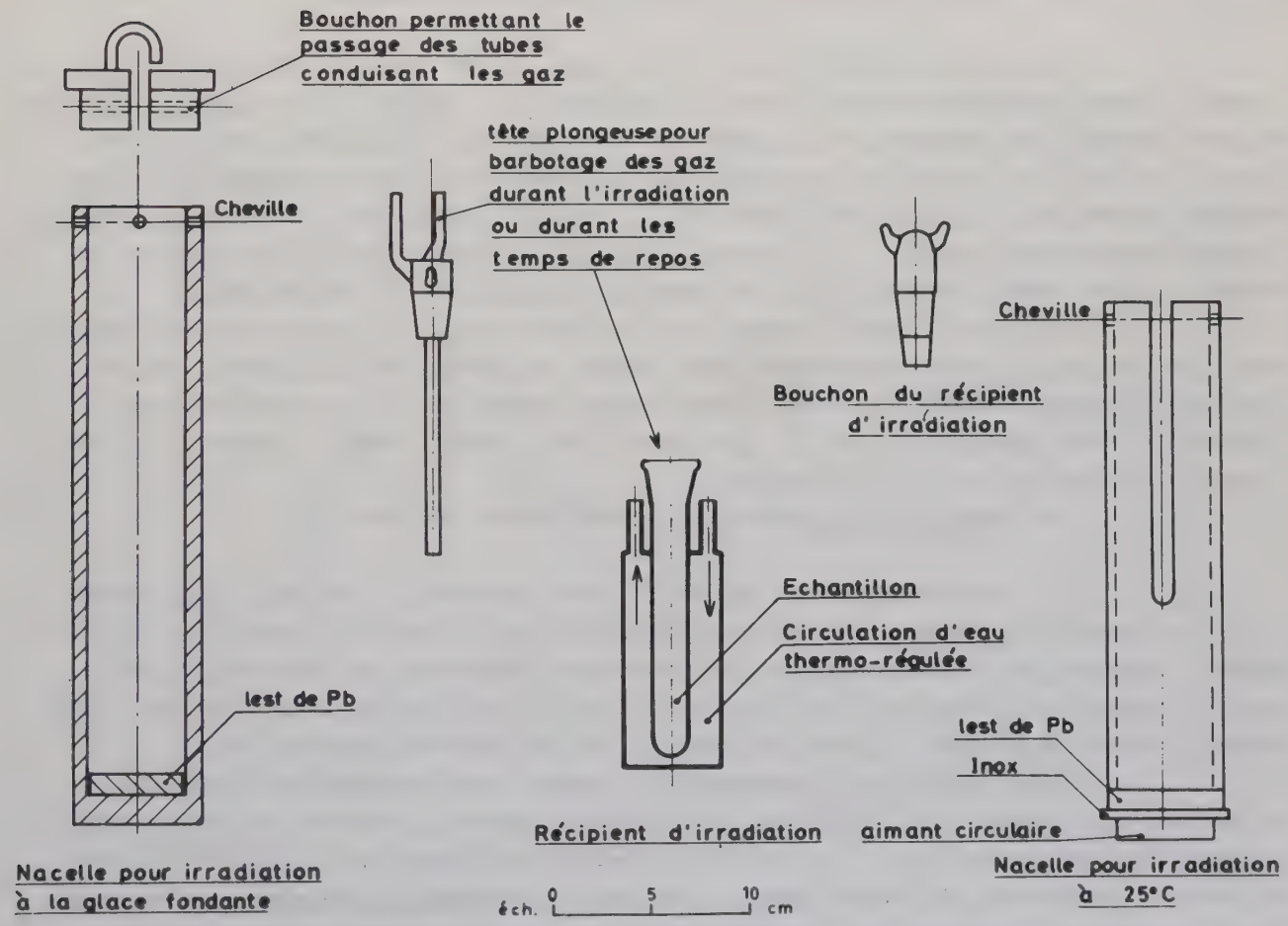


Fig. II. 9 b – Dispositif d'irradiation aux rayons γ.

l'échantillon est le 1/100 de la dose reçue lorsqu'il est en place.

A la descente, la nacelle atteint rapidement sa vitesse limite et parcourt les 3,30 m de descente en 5 à 6 secondes. A la remontée, le premier mètre est parcouru en 1/5 de seconde. Les sources ayant 30 cm de haut, on peut estimer que la valeur de l'erreur portant sur la dose totale est voisine de la quantité de rayonnements que reçoit l'échantillon en 1 seconde lorsqu'il est en place.

Selon les sources utilisées, leur âge, leur nombre et leur position, on a obtenu des débits de doses de 0,4 ; 0,85 ; 2 ; 10 ; 24 krad.mn^{-1}. En utilisant l'aileron de l'irradiateur, on a pu soumettre des échantillons à un débit de dose de 0,06 krad.mn^{-1}. Le spectre des rayons gamma du Cobalt 60 est dégradé par la présence de l'eau, des enveloppes de pyrex, nylon et acier inoxydable, et les réflexions sur les parois.

La température de l'eau de la piscine est de 18°C. On a cherché à maintenir les suspensions irradiées à 25°C et 0°C. Pour la température de 25°C, on fait circuler l'eau d'un bain thermorégulé à 27°C. Quand le récipient d'irradiation est en place, l'eau qui revient au bain est à 23°C : on est donc certain de limiter les fluctuations de température de l'échantillon entre 25°C et une température inférieure à 27°C depuis l'insertion du récipient d'irradiation sur le circuit du bain jusqu'à la fin de l'irradiation. Pour les irradiations à 0°C, les récipients d'irradiation préalablement refroidis à 0°C sont placés dans une nacelle fermée remplie de glace pilée.

Il faut signaler que les dispositifs de culture sont installés au bord de la piscine d'irradiation, ce qui permet de réduire à quelques minutes le temps qui s'écoule entre le prélèvement dans la culture et l'irradiation du 1er échantillon.

2 - Irradiations aux rayons X : Les rayons X ont été utilisés ici en raison de leur souplesse d'emploi. Mais les générateurs de rayons X mis à notre disposition, à tubes scellés à anti-cathode de tungstène, ne fournissaient que des débits de dose d'au plus 2 krad.mn^{-1} au niveau des échantillons, ce qui est insuffisant pour réaliser des irradiations aiguës de Chlorelles (voir chapitre III). La figure II.10 donne le spectre de rayonnement des appareils utilisés : ce spectre a été obtenu à l'aide d'un cristal d'iodure de sodium ; il est voisin de celui qui a été donné par SKARSGARD et JOHNS (1961).

Nous avons irradié d'abord avec un générateur à tube auto-redresseur SECURIX 22-12 de la C.G.R. Paris, pour lequel l'anti-cathode se trouve soumise, durant une demi-période de chaque période de courant, à une tension variant de 0 à la tension de crête ($180 \times \sqrt{2} = 250$ volts, ou $220 \times \sqrt{2} = 310$ volts). Nous avons pu ensuite employer un générateur à courant continu PHILIPS MH 301.

Les dispositifs d'irradiation sont décrits dans la figure II.11.

3 - Dosimétrie : La dosimétrie des rayonnements utilisés a été effectuée avec une chambre d'ionisation dé (appareil ROENTGEN RATE METER, model 510, VICTOREEN, chambre 610) et par dosage au sulfate ferreux (dosimétrie de FRICKE). Il faut ajouter des essais de dosimétrie au fluorure de lithium, par diode et dans le cas de l'irradiateur gamma en piscine, un calcul de dose à partir de l'activité des sources.

Les appareils ou les substances de mesure sont toujours mis à la place de la suspension d'algues avec les mêmes enveloppes que celles qui séparent les algues des sources lors des irradiations. Pour les rayons gamma, en raison de la présence de l'eau, la chambre d'ionisation est placée dans un récipient de verre pyrex qui enveloppe complètement la chambre d'ionisation et le préamplificateur ; l'ensemble est rendu étanche par un

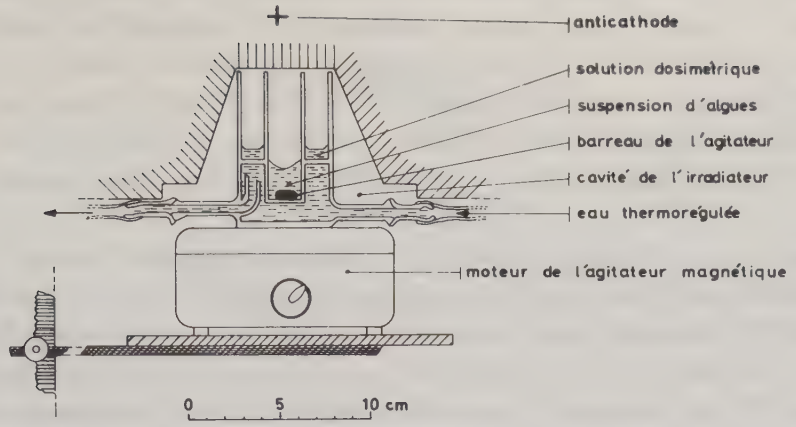


Fig. II.10 – Spectre des rayons X utilisés (étudié par J. CHABERT).

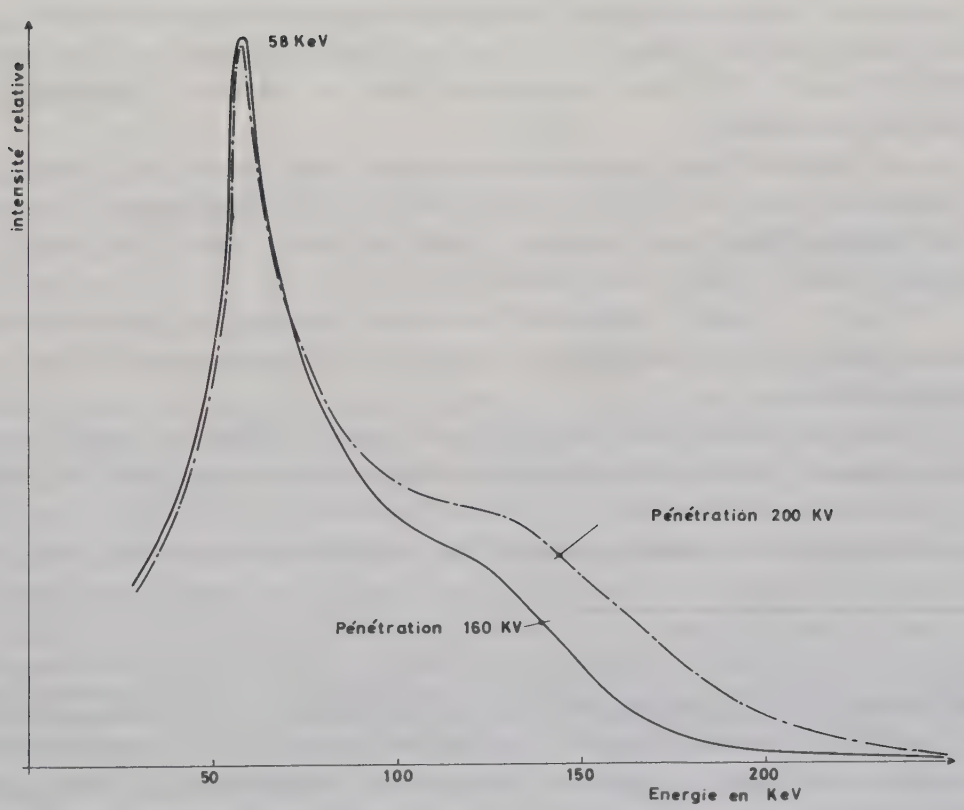


Fig. II.11 – Un des dispositifs d'irradiation aux rayons X.

N.B. On a déterminé le rapport entre la dose reçue dans le tube et celle reçue par la couronne en remplaçant la suspension d'algues par le même volume de solution dosimétrique de FRICKE.

bouchon scellé à l'araldite qui laisse passer le câble de mesure.

Pour une étude comme celle-ci, la dosimétrie de FRICKE présente les avantages suivants : densité de la solution dosimétrique voisine de la densité moyenne du matériel vivant, précision de ± 2 % sur les mesures, gamme de doses de 4 à 50 krad pour les doses intégrées et de 20 à 20.10^9 rad.mn^{-1} pour les débits de dose, utilisation possible avec des rayonnements corpusculaires et électromagnétiques d'énergies très variées. On trouvera dans FRICKE et HART (1966) et dans LAW (1970) une mise au point détaillée de cette dosimétrie.

Nous avons utilisé les normes de l'ASTM Committee (rapport D 1671-99) et les données de DRAGANIC, HOLM, MAUL (1961) (RISO Report n° 22) : solution dans une dilution H_2SO_4 à 0,8 N dans de l'eau désionisée distillée pour éviter la présence de matières organiques, de sel de MOHR ($FeSO_4 (NH_4)_2 SO_4$, 6 H_2O à 10^{-3} M (0,392 $g.l^{-1}$) et de NaCl à 10^{-3} M (0,058 $g.l^{-1}$) qui diminue la sensibilité de la solution à la présence d'impuretés organiques ; irradiation dans les mêmes conditions que la suspension de Chlorelles dans des récipients de pyrex nettoyés au mélange sulfo-chromique et rincés à l'eau désionisée et distillée ; durée d'irradiation suffisante pour avoir une dose comprise entre 10 et 20 krad ; dosage des ions ferriques créés par spectrophotométrie à 305 nm (305 mμ).

Pour un dosage effectué à 25°C, la dose en rad est égale à la densité optique multipliée par le facteur $2,74.10^4$ pour des rayonnements de ^{60}Co. Si le dosage est effectué à une température différente, il faut tenir compte du changement du coefficient d'extinction des ions ferriques à 305 nm (voir les valeurs données par FRICKE et HART, 1966).

L'écart entre les valeurs extrêmes d'une série de mesures effectuées au même moment, avec la même solution, dans les divers récipients d'irradiation, est au plus de 7 % de la valeur moyenne. Entre les valeurs moyennes obtenues sur deux séries de mesures séparées par un intervalle de plusieurs mois, on retrouve l'influence de la décroissance de l'activité du Cobalt.

La confiance dans la valeur absolue des doses repose sur l'accord entre tous les types de dosimétrie ou le calcul et surtout sur une série de mesures effectuées sur un irradiateur de Cobalt étalonné par ailleurs*. Dans ce dernier cas, l'écart entre les données de l'étalonnage et nos mesures a été compris entre 4 et 5 %.

Mais, du fait de l'utilisation des mêmes sources, les doses relatives dans une expérience donnée et d'une expérience à l'autre sont connues avec la même précision que la durée de l'irradiation.

Dans ce travail, lorsque l'on dit que les Chlorelles ont absorbé une dose de x rads, cela revient à dire qu'une solution de sulfate ferreux placée dans les mêmes conditions que la suspension de Chlorelles a reçu une dose de x rad. Nous n'avons aucun renseignement sur l'énergie effectivement absorbée par les Chlorelles en chaque site cellulaire.

Nous remercions les groupes de mesure du Service de Protection et des Laboratoires de Haute Activité (S.P.L.H.A.) et de la Section d'Application des Radioéléments (S.A.R.) du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, qui ont effectué les dosimétries au fluorure de lithium et par diode, et qui ont contrôlé nos dosimétries de FRICKE par le calcul.

---

* Installation de l'Institut Gustave Roussy ; étalonnage effectué par Madame DUTREIX que nous remercions de son aide.

CHAPITRE III

PREMIERE PARTIE

ANALYSE DE LA SURVIE CLONALE CHEZ LES CHLORELLES

Les courbes de survie obtenues après une irradiation expriment le comportement d'une population de cellules par rapport à un critère qui se définit à l'échelle individuelle, à savoir la survie clonale. Avant d'exposer les résultats obtenus avec les courbes de survie, il y a lieu d'étudier la mise en évidence de la survie clonale chez les Chlorelles, la formation des clones et la détermination du taux de survie clonale.

1 - MISE EN EVIDENCE DE LA SURVIE CLONALE CHEZ LES CHLORELLES

Les Chlorelles ne présentent pas de phénomènes de sexualité ; donc toute cellule qui se multiplie est à l'origine d'un clone, et, dans les ensemencements sur milieu gélosé, colonie est synonyme de clone quand les cellules ont été suffisamment isolées entre elles lors de l'ensemencement.

On a considéré ici qu'une Chlorelle conserve son pouvoir de multiplication si, après ensemencement sur milieu gélosé, elle donne naissance à un clone visible à l'oeil nu, après un délai suffisant pour que, dans un ensemencement portant sur au moins 1000 cellules, de nouveaux clones n'apparaissent plus. Dans les conditions auxquelles sont soumises les cultures, un délai de 7 à 10 jours s'est avéré suffisant, même pour les algues qui survivent à une irradiation.

Lors du dénombrement, les clones ont 0,2 à 0,5 mm de diamètre, ce qui correspond à un nombre de cellules compris entre 10^4 et 6.10^4 cellules ; ce nombre est grossièrement en accord avec le comptage au compteur électronique des algues qui proviennent de la remise en suspension d'un nombre connu de clones dans un volume donné de milieu.

Le facteur de multiplication d'une Chlorelle (nombre de cellules-filles issues d'une seule cellule-mère) varie de 4 à 16. Les facteurs qui déterminent ce nombre ne sont pas connus, mais ils semblent liés au milieu de culture et à l'éclairement utilisés (NĚCAS, 1969).

Les auteurs qui travaillent sur des cellules de mammifères considèrent qu'un clone est viable lorsqu'il contient 50 à 100 cellules, ce qui représente 5 ou 6 divisions par bipartition à partir de la cellule-mère (par exemple : HALL et BEDFORD, 1964). Ces clones viables, même ceux qui proviennent d'une cellule irradiée, peuvent être cultivés en milieu liquide durant plusieurs mois.

Chez les Chlorelles non irradiées, une proportion faible (moins de 1 %) des cellules donne des colonies dont le diamètre est inférieur à celui des autres. Les causes

possibles sont l'allongement du cycle, la diminution du nombre de cellules-filles à chaque génération, la perte cellulaire importante, ou ces trois causes combinées.

La fréquence des colonies à diamètre réduit augmente quand la dose du rayonnement augmente. Ce fait s'expliquerait par l'existence de clones dont une partie des cellules cesse de se multiplier (voir le paragraphe suivant) et de clones atteints de dégâts non létaux et transmissibles dus à l'irradiation.

TODD (1967), NIAS et FOX (1968) ont montré qu'il existait, après irradiation, des cellules de mammifères au métabolisme déficient. SINCLAIR (1964) avait déjà expliqué l'apparition de colonies de diamètre réduit par l'existence, après irradiation, de dégâts non létaux et transmissibles. BERRY (1967) a repris cette explication mais s'étonne de ce que la fréquence des petites colonies s'élève quand la dose d'irradiation atteint 1000 rads (taux de survie de $1,2.10^{-2}$) ; cet auteur pense à une altération du milieu de culture. On peut rapprocher ce résultat de celui de BEDFORD et HALL (1966) : pour une dose entraînant un taux de survie compris entre 10^{-4} et 10^{-5} le nombre de clones dénombrables décroît quand la densité en cellules mortes augmente sur la boîte d'ensemencement.

Il est arbitraire de décider du diamètre à partir duquel on classera une colonie comme étant "de diamètre réduit". De plus, l'expérimentation suivante a révélé la complexité du problème chez les Chlorelles.

Une suspension de Chlorelles non irradiées, contenant 200.10^6 cellules par millilitre, est diluée au 200.000ème avec du milieu neuf ou du milieu P. Le milieu P a été obtenu à partir d'une suspension de Chlorelles de 200.10^6 cellules par millilitre, de la façon suivante : on irradie cette suspension à 125 krad (suspension irradiée I ; pratiquement, à cette dose, aucune cellule n'est survivante) ; cette suspension est replacée durant huit jours dans les conditions habituelles de culture ; elle est alors débarrassée, par centrifugation à 8300 g pendant 15 mn, des débris cellulaires, puis stérilisée à froid par filtration sur membrane d'acétate de cellulose.

La dilution des Chlorelles non irradiées – que la dilution ait été effectuée avec le milieu normal ou le milieu P, – est ensemencée à raison de 1 ml pour 2 boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, sur membrane d'acétate de cellulose placée sur du milieu gélifié. Le support est soit laissé tel quel (support normal), soit traité selon les indications du tableau ci-dessous qui fournit aussi les résultats.

Désignation du traitement	Traitement du support d'ensemencement	Milieu de dilution	Fréquence des colonies de petit diamètre
Témoin	normal	normal	normale
A	normal	milieu P	normale
B	apport de 1 ml de milieu P par boîte	normal	normale
C	apport de 1 ml de suspension I par boîte (présence de cellules non survivantes)	normal	plus élevée
D	apport d'une suspension de diatomite	normal	plus élevée

De cette expérience, il ressort que :

1) le milieu où se lysent les cellules irradiées n'empêche pas la multiplication des Chlorelles ;

2) l'existence d'une gêne mécanique explique la formation de certaines colonies de petit diamètre. Le développement des Chlorelles est donc facilement perturbé, puisque dans le cas C, les cellules irradiées couvrent environ 20 % du filtre (surface moyenne d'une algue 8 μ^2) et, d'après le fabricant, les pores représentent 80 % de la surface du filtre.

En raison de ces résultats, ont été dénombrés, sans distinction de taille, tous les clones visibles à l'oeil nu après un certain délai. Dans le cas où le taux de survie est supérieur à 10^{-4}, un délai de huit jours est suffisant et un dénombrement effectué un mois plus tard, avant une dessication trop prononcée du milieu gélifié, donne le même résultat. Pour les taux de survie inférieurs à 10^{-4}, les résultats sont moins dispersés si l'on porte le délai à 9 ou 10 jours.

De toute manière, on peut considérer que tous les clones dénombrés pourraient être à l'origine d'une culture illimitée : le mode de culture sur milieu purement minéral gélosé élimine les cellules qui ont subi des mutations trop sévères pour leur métabolisme ; en milieu liquide, ce sont les cellules-filles à pouvoir de multiplication le plus important (grand nombre d'autospores, durée de cycle court) qui peuplent les cultures successives.

Les irradiations ont été effectuées à l'obscurité. On obtient le même nombre de clones survivants, que la remise en culture à la lumière ait lieu dès la fin de l'irradiation ou plusieurs heures plus tard.

2 - ETUDE DE LA FORMATION DES CLONES

Sur du milieu gélosé recouvrant une lame porte-objet, on peut suivre la formation des clones au microscope en repérant la position de chaque cellule par le relevé de ses coordonnées sur la platine du microscope. Cette technique est à rapprocher de ce qui a été fait récemment sur les cellules de mammifères (HURWITZ et TOLMACH, 1969 ; THOMPSON et SUIT, 1969).

Cette méthode permet une étude individuelle de chaque cellule. Mais l'expérimentateur ne peut pas observer le développement de plus d'une centaine d'individus à la fois, ni suivre plus de trois générations en raison du facteur de multiplication élevé des Chlorelles.

Chez les algues non irradiées, toutes les cellules se divisent en 4, 8 ou 16 (planche III.1). Pour les algues irradiées, les planches III.2 et III.3 montrent les divers cas possibles :

- ou bien les algues ne se divisent pas ; la cellule gonfle, son contenu devient granuleux et souvent la membrane cellulosique cède, libérant des granules ;
- ou bien les algues se divisent avec un nombre de cellules-filles égal à celui qui est libéré par les algues non irradiées ; ces cellules peuvent évoluer normalement ou bien, toutes ou certaines d'entre elles meurent. Ceci pourrait expliquer la formation, à partir de cellules irradiées, d'une part de colonies de diamètre inférieur aux colonies de même âge issues d'algues non irradiées et d'autre part de clones présentant des secteurs clairs. Ce dernier phénomène est à rapprocher du "lethal sectoring" de levures diploïdes qui a été signalé par JAMES et WERNER (1966) et dont la persistance a été suivie par JAMES, WERNER, SAUNDERS et HARRIS (1968).

La plupart des Chlorelles qui se divisent après irradiation subissent cette division dans un délai qui semble normal dans le cas d'observation au microscope effectuées

Légende des Planches

Planche III.1 : exemples de développement de clones provenant de Chlorelles non-irradiées.

Planche III.2 : exemples d'évolution de Chlorelles irradiées non-survivantes.

Planche III.3 : exemples d'évolution de Chlorelles irradiées survivantes.

L'échelle est la même pour toutes les figures des trois planches. Les plus petites cellules ont environ 2 μ de diamètre. Les jours sont comptés à partir du jour de l'ensemencement. Les algues irradiées ont reçu 10 ou 15 krad.

Le cas particulier est celui d'une colonie présentant des secteurs clairs.

PLANCHE III-1

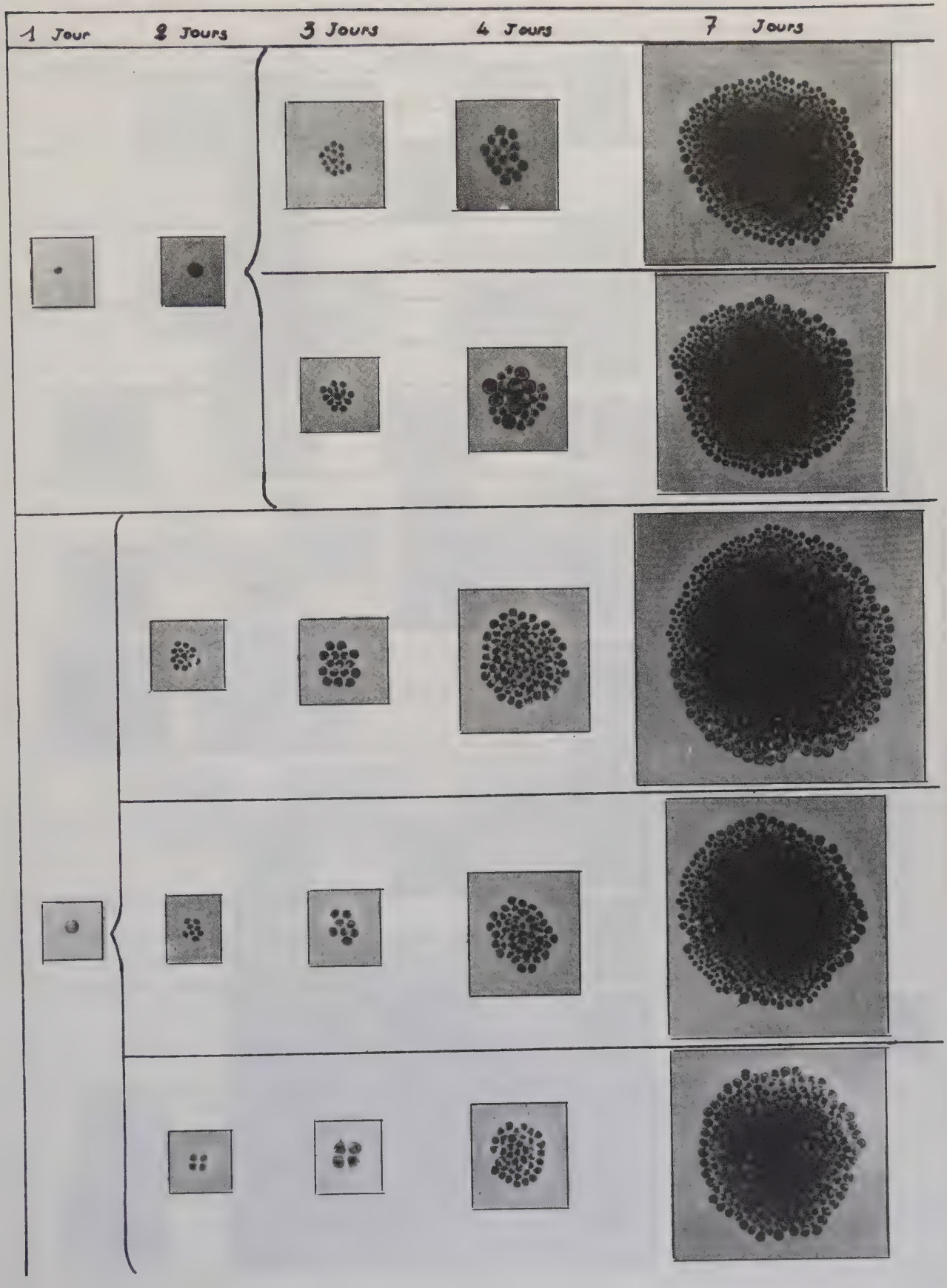


PLANCHE III.2

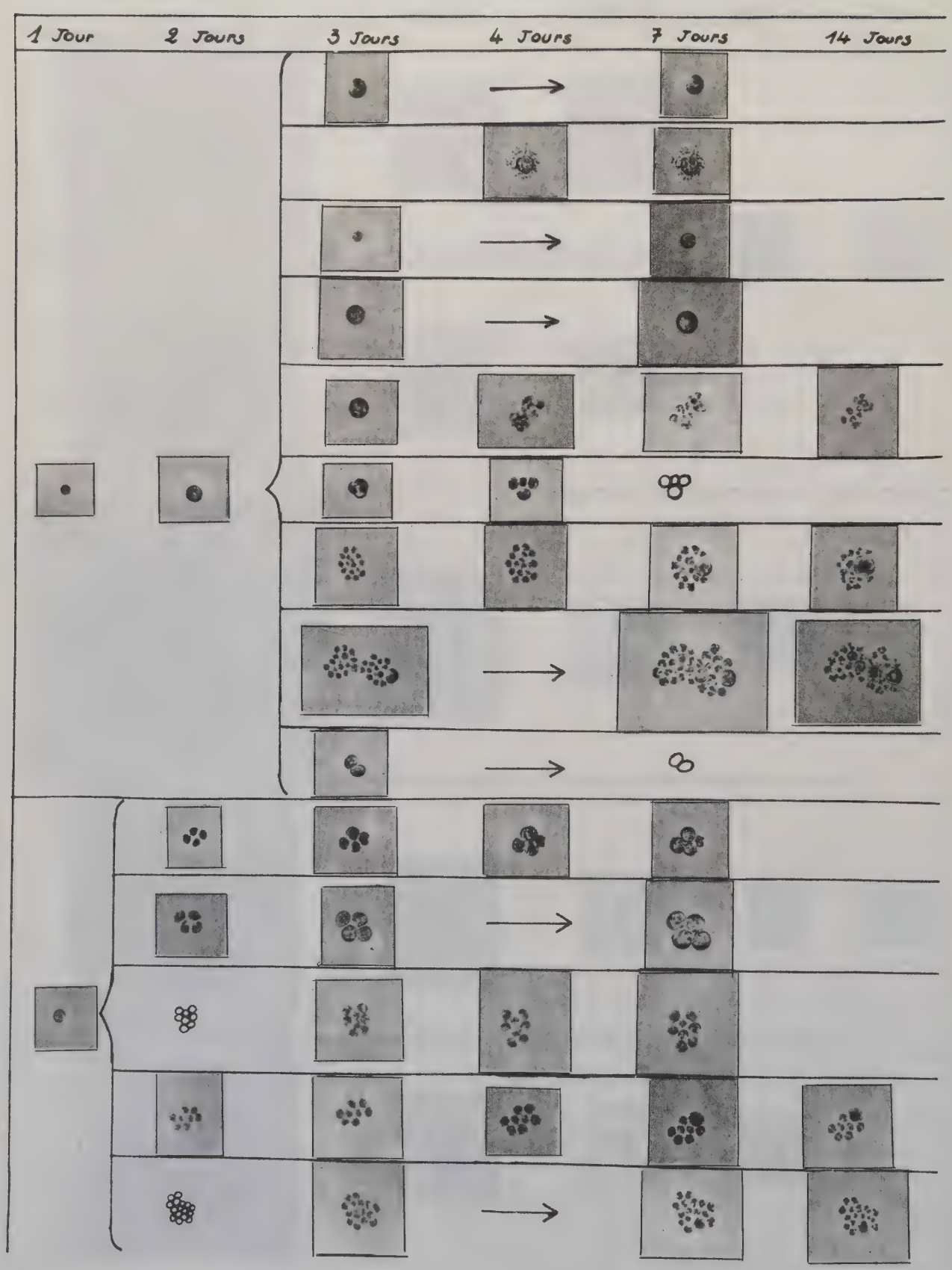
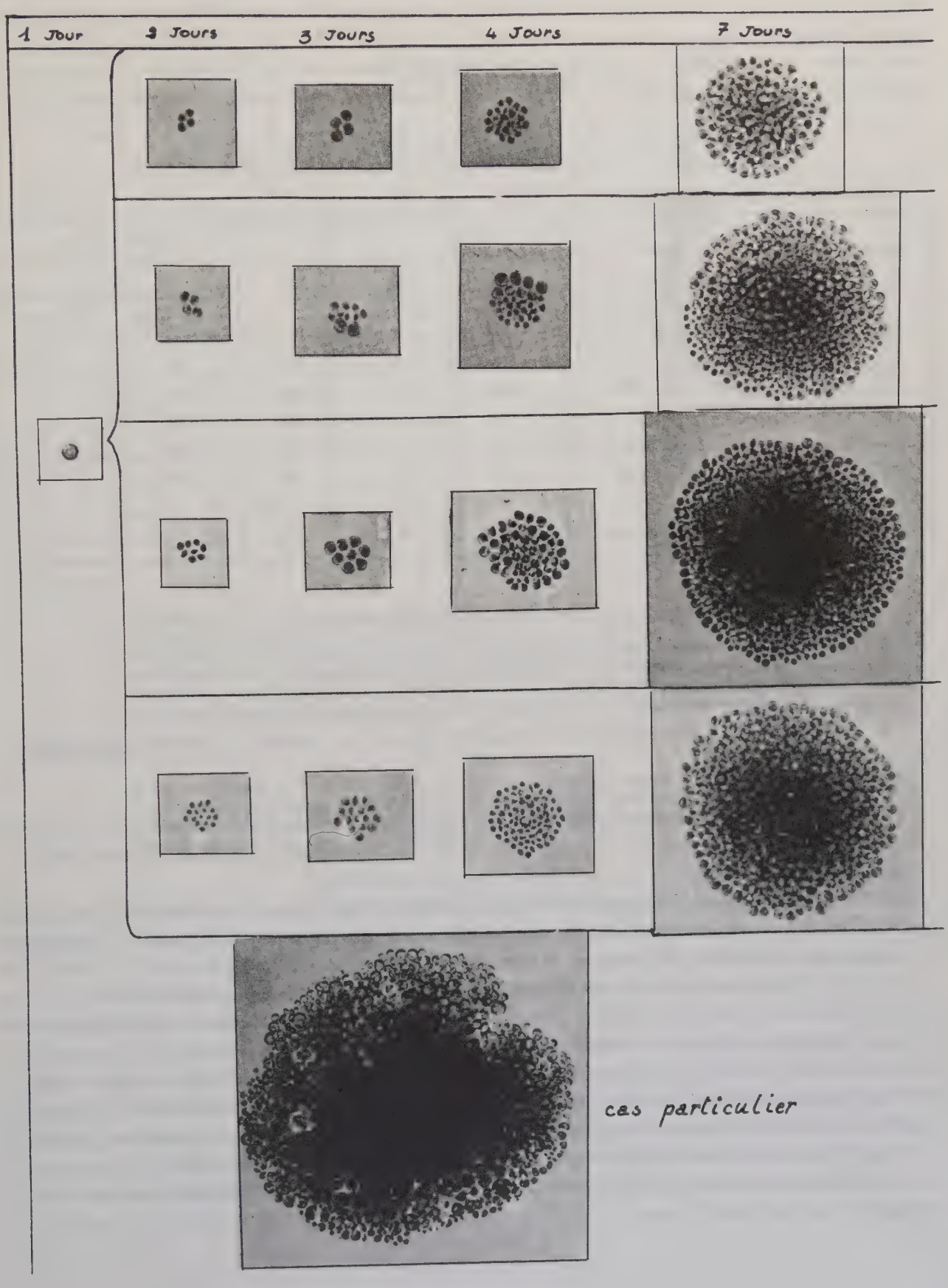


PLANCHE III.3



chaque jour. Les cellules qui subissent un retard de 24 ou de 48 heures sont moins nombreuses ; cette remarque s'applique également à la deuxième division.

Avec les Chlorelles où le facteur de multiplication est souvent de 8 et atteint 16, il est difficile de suivre au microscope optique l'évolution d'un clone pour deux cycles cellulaires. C'est pourquoi les nombres du tableau III.1 qui illustrent cette remarque sont tirés de l'observation de Scenedesmus crassus Chodat, algue chlorophycée voisine des Chlorelles, mais chez laquelle le facteur de multiplication est pratiquement toujours égal à 4.

TABLEAU III.1

Doses en krad (rayons X)	a	1ère division			c	2ème division	
		b				d	
		2e jour	3e jour	4e jour		3e jour	4e jour
0	524	402	89	*	*	*	*
5	190	99	44	*	683	244	*
8	154	99	34	2	585	271	*
10	231	117	34	*	609	183	16
30	102	21	6	0	79	0	0
60	64	4	0	0	18	0	0
100	56	1	0	0	4	0	0

Les jours sont comptés à partir de l'irradiation.

a est le nombre initial de cellules suivies au microscope ;
b est le nombre de cellules qui ont subi la 1ère division ;
c est le nombre de cellules-filles issues de la 1ère division ;
d est le nombre de cellules-filles qui ont subi la 2ème division ;
* indique que le dénombrement n'a pas été possible en raison du nombre trop élevé de cellules.

Les Chlorelles qui, après irradiation, ne se divisent pas, n'atteignent pas une taille supérieure à la taille des cellules non irradiées. Cependant, quelques cellules ayant un grand diamètre (13 μ) ont pu être observées au microscope.

Au compteur électronique de particules, même couplé à un sélecteur multicanal pour une analyse fine de la population, on ne distingue pas l'effet de ces grosses cellules sur le diagramme des tailles, en raison de leur faible importance numérique.

Il en est peut-être de même chez les cellules de mammifères cultivées in vitro alors que LEE et RICHARDS (1965) ont invoqué des changements de conductivité des cellules gonflées modifiant la réponse du compteur électronique de particules pour expliquer les différences obtenues au microscope et au compteur de particules. D'ailleurs, pour les cellules de mammifères, les auteurs ne sont pas d'accord. KLIMEK et VLĂSINOVÁ (1963) relèvent une indépendance entre l'accroissement de volume et la dose d'irradiation, ce qui n'est pas l'avis de ROSENBERG et GREGG (1969). Chez les Chlorelles, il n'y a pas formation de cellules géantes par fusion cellulaire comme chez les cellules de mammifères (HURWITZ et TOLMACH, 1969).

Avec les moyens d'investigation utilisés ici, il est difficile de distinguer le gonflement des cellules dû à la poursuite de l'anabolisme d'avec celui qui accompagne la lyse cellulaire. Cependant, le tableau III.2 permet d'affirmer que l'anabolisme peut se poursuivre durant 3 jours après une irradiation de 165 krad.

TABLEAU III.2

Doses en krad	Quantité d'O_2 en $\mu l.ml^{-1}.h^{-1}$ apparaissant dans le milieu						
	0 jour	1 jour	3 jours	6 jours	7 jours	9 jours	10 jours
0	26,1	10,2				16,7	
150	23,5	12,1	15,3			1,4	
0	28,5				24		26,9
150	16,0				4,8		1,0
0	38,1						
165	34,0						
0	29,2		19,7	19,7	24,3		18,6
165	22,9		18,1	1,4	0,4		0,6

Légende :

Echanges d'oxygène entre les algues et le milieu
15 ml de suspension algale reçoivent sur une surface de 10 cm^2 un éclairement de 6000 lux issu d'une lampe à incandescence. Les mesures sont effectuées par ampérométrie (méthode de DE KOUCHKOVSKY, 1963) à 25°C. Les valeurs données dans le tableau représentent une quantité d'oxygène fournie au milieu par les algues. Les jours sont comptés à partir de l'irradiation.

Remarque :

Les résultats sont à comparer à l'intérieur de chaque lot de 2 échantillons, un échantillon qui a été irradié, un échantillon témoin qui ne l'a pas été. En effet, chaque jour on a utilisé un lot différent de façon à effectuer les mesures sur des échantillons axéniques.

WETHERELL et KRAUSS (1957) distinguaient chez les Chlorelles la mort sans division par action des rayons ultra-violets, de la mort après plusieurs divisions par action des rayons X. Cette distinction n'est pas si nette si l'on observe des Chlorelles irradiées 80, 100, 160 secondes, à 2000 $erg.s^{-1}.cm^{-2}$ avec une lampe à basse pression de vapeur de mercure (80 % de l'énergie à 2537 Å).

De cette partie expérimentale, il faut retenir que les Chlorelles sont un matériel vivant bien adapté aux études portant sur la survie clonale : les colonies qui proviennent d'une cellule sont bien des clones puisqu'il n'y a pas de sexualité ; le nombre de clones qui deviennent visibles à l'oeil nu semble indépendant de nombreux facteurs ; on peut lire la réponse à une expérimentation dans un délai assez court. Le seul inconvénient de l'utilisation des Chlorelles pour ces études est le fait que le taux de multiplication varie d'une cellule à l'autre.

3 - DETERMINATION DES TAUX DE SURVIE CLONALE

Dans ce travail, les courbes de survie sont tracées à partir des déterminations des taux de survie pour 4 à 7 doses s'échelonnant entre 7 et 70 krad. Chaque détermination repose sur le dénombrement de colonies. Ces colonies proviennent des cellules capables de se multiplier qui étaient en suspension dans 1 ml d'inoculum ensemencé sur 2 boîtes de Pétri. On répète 3 ou 4 fois cet ensemencement et on effectue la moyenne des 3 ou 4 dénombrements. On cherche à obtenir 200 à 500 clones par boîte de Pétri en ajustant, par dilution avec du milieu de culture stérile, la densité cellulaire de l'inoculum.

Si N_T est la moyenne des résultats des dénombrements de colonies effectués sur les ensemencements avec la suspension d'algues non irradiées, si N_D est la moyenne de ceux effectués sur les ensemencements de la même suspension d'algues, mais F fois plus concentrée et irradiée à la dose D, le taux de survie sera :

$$S = \frac{N_D}{N_T \times F}$$

Si l'on s'en tient au rappel de PORTER (1970), la variance de Log S est la somme des variances de Log N_D et Log N_T, donc la somme des inverses de N_D et N_T, N_D et N_T suivant une loi de POISSON. Comme nos dénombrements ont été, dans la grande majorité des cas, compris entre 100 et 1000, la variance de Log S est restée comprise entre 0,01 et 0,001.

En fait, la précision des dénombrements augmente d'abord avec le nombre de colonies, puis décroît quand ce nombre continue à s'élever en raison des fusions de clones inévitables quand la densité des colonies survivantes est trop élevée.

En l'absence d'une étude expérimentale et statistique suffisante, nous avons préféré ne pas mentionner sur les graphiques l'estimation de la précision des résultats. Dans la bibliographie, les barres d'erreur portées sur les graphiques sont rarement justifiées.

CHAPITRE III

DEUXIEME PARTIE

ANALYSE DES COURBES DE SURVIE

A - REMARQUES PRELIMINAIRES

1 - Généralités

Les valeurs expérimentales obtenues pour des taux de survie allant de 1 à 10^{-6} ou même 10^{-7} conduisent à tracer des courbes d'allure exponentielle après une partie non exponentielle. En coordonnées arithmétiques, ces courbes sont des sigmoïdes ; en coordonnées semi-logarithmiques (en abscisse, échelle arithmétique des doses ; en ordonnées, les taux de survie, échelle logarithmique) ce sont des droites après un épaulement (fig.III.1).

On est en droit de penser que les phénomènes qui se déroulent chez les Chlorelles depuis l'irradiation jusqu'au dénombrement des clones survivants sont les mêmes que chez toutes les autres cellules, dont la plupart présentent ce type de courbes de survie : autres algues comme Chlamydomonas (DAVIES, 1969) ; nombreuses levures, cellules de plantes supérieures, cellules de mammifères (voir des traités généraux de radiobiologie comme celui de ELKIND et WHITMORE, 1967, ou des Comptes Rendus de Congrès comme SILINI, 1967).

Certaines bactéries ont des réponses semblables à celles des Chlorelles en ce qui concerne la survie clonale après irradiation, et il est vraisemblable qu'au niveau moléculaire, les effets de l'irradiation sont comparables chez les bactéries et chez les Chlorelles. Cependant, ici, les discussions des résultats feront plutôt appel aux travaux effectués chez les eucaryotes dont font partie les Chlorelles.

Pour toutes les courbes de survie à épaulement, les variations du taux de survie restent dans le domaine des erreurs expérimentales lorsque ce taux est voisin de 1. C'est pourquoi les auteurs précisent surtout la partie exponentielle qui a une grande importance théorique et pratique.

La partie exponentielle est représentée par une droite en coordonnées semi-logarithmiques. Deux paramètres, n et k, suffisent à définir la courbe de survie ramenée à sa partie exponentielle : ne^{-kD} (fig. III.1).

La théorie de la cible a donné un sens biologique aux paramètres n et k : n représenterait un nombre de cibles et k une probabilité d'atteinte de ces cibles ; k est souvent exprimé comme l'inverse d'une dose Do. La plupart des auteurs, tout en estimant qu'au niveau moléculaire les phénomènes dus à l'irradiation sont loins d'être connus, se réfèrent à ces mêmes paramètres n et Do, sans leur donner de sens biologique. Ils nomment n nombre d'extrapolation et Do radiosensibilité.

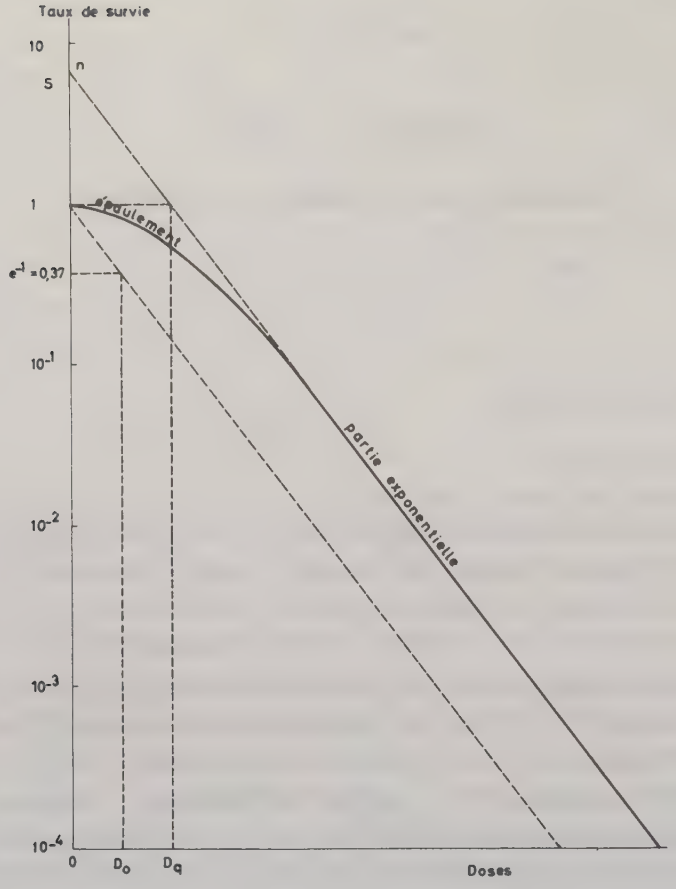


Fig. III.1 : Définition des paramètres utilisés.

Afin que l'on puisse comparer les résultats exposés ici avec les résultats fournis par la bibliographie, les courbes seront traduites par ces paramètres n et Do, Do étant exprimé en krad.

Certains auteurs comme DAVIES (1966) ont traduit la partie exponentielle des courbes de survie par les paramètres Do et la dose quasi-seuil Dq telle que :

$$e^{-\frac{Dq}{Do}} = 1/n$$

(voir fig. III.1). Cette valeur sera également donnée ici, et elle sera exprimée en krad.

2 - Reproductibilité des résultats

La figure III.2 présente les résultats obtenus en répétant 3 fois, dans un délai de 4 heures, une expérience d'irradiation sur une même culture en masse de 9 jours, de densité cellulaire 180.10^6 cellules par millilitre (débit de dose : 10,2 krad.mn^{-1} ; température : 25°C ; obscurité ; pas de barbotage de gaz durant l'irradiation ; chaque irradiation a lieu immédiatement après le prélèvement).

Le tableau III.2 indique les valeurs des paramètres :

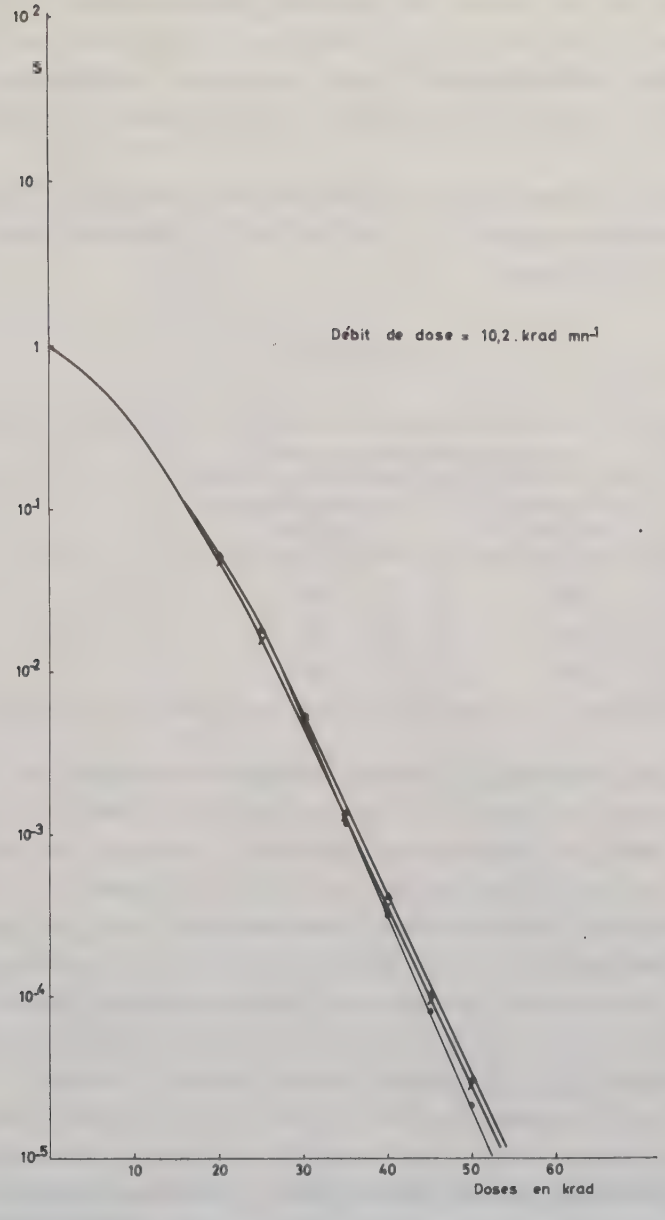


Fig. III.2 – Illustration de la reproductibilité des courbes de survie. La figure donne trois courbes de survie effectuées dans les mêmes conditions sur une même population de Chlorelles.

TABLEAU III.2

N° des expériences	n	Do	Dq
1	11	3,6	10,8
2	9	3,9	8,8
3	10	3,9	8,8

Sur la figure III.2, on remarque que, pour chaque dose, les points définissant chacune des trois courbes sont placés dans le même ordre. C'est donc que, pour une dose d'irradiation donnée, les taux de survie sont modifiés par certaines conditions d'expérience. Ce fait est confirmé par le tableau III.3 qui donne les valeurs des paramètres de trois courbes, obtenues comme précédemment ; mais, dans cette expérience, les échantillons ont subi des temps d'attente - entre le prélèvement dans la culture et l'irradiation - sans barbotage de gaz.

Alors que ce temps d'attente dans les récipients d'irradiation a été de 15 à 45 minutes pour la première courbe, il a duré de 60 à 90 minutes pour la deuxième et de 90 à 120 minutes pour la troisième.

TABLEAU III.3

N° des courbes	Temps d'attente (en mn)		n	Do	Dq
	1er échant. irradié	Dernier échant. irradié			
1	15	45	5,5	5,2	8,8
2	60	90	1,8	7,1	4,8
3	90	120	1,9	7,4	4,4

Dès que le barbotage du mélange air-gaz carbonique (en volume : air 96 %, CO_2 4 %) cesse, les algues abaissent par leur respiration la teneur en oxygène dissous du milieu. Par exemple, dans nos récipients d'irradiation, la teneur en oxygène dissous de 5 ml d'une suspension de 200.10^6 Chlorelles par millilitres passe de 7,5 à 3,2 ppm par litre - en poids par volume - en une heure (mesures effectuées par polarographie) ; un barbotage de 3 mn du mélange air-CO_2 ramène la teneur à 7,5 ppm par litre.

De plus, l'irradiation provoque un départ d'oxygène comme l'a mesuré EVANS (1969) pour une solution de tris-acétate irradiée avec des rayons X de 250 kVp (la pression d'oxygène devient pratiquement nulle lorsque la dose atteint 15 krad).

On peut donc suspecter un état d'anoxie plus ou moins complet lors de l'irradiation. La bibliographie donne surtout des résultats obtenus à très faible teneur en oxygène dissous, de l'ordre de quelques parties par million, et on peut citer, pour les bactéries, ALPER (1968) ; pour Chlamydomonas, BRYANT (1968) et DAVIES et THORBURN (1968) ; pour des graines de Vesces, HALL et CAVANAGH (1969) ; pour des cellules de mammifères, HALL et coll. (1966).

Il s'agirait bien d'un effet de l'état d'anoxie, comme le prouve l'expérience réalisée dans les mêmes conditions que l'expérience précédente, mais où un groupe d'échantillons utilisés pour tracer une courbe est mis en attente avec barbotage d'un mélange air 96 %, CO_2 4 %, dans la suspension d'algues. Les résultats de cette expérience sont donnés dans la figure III.3 et le tableau III.4 :

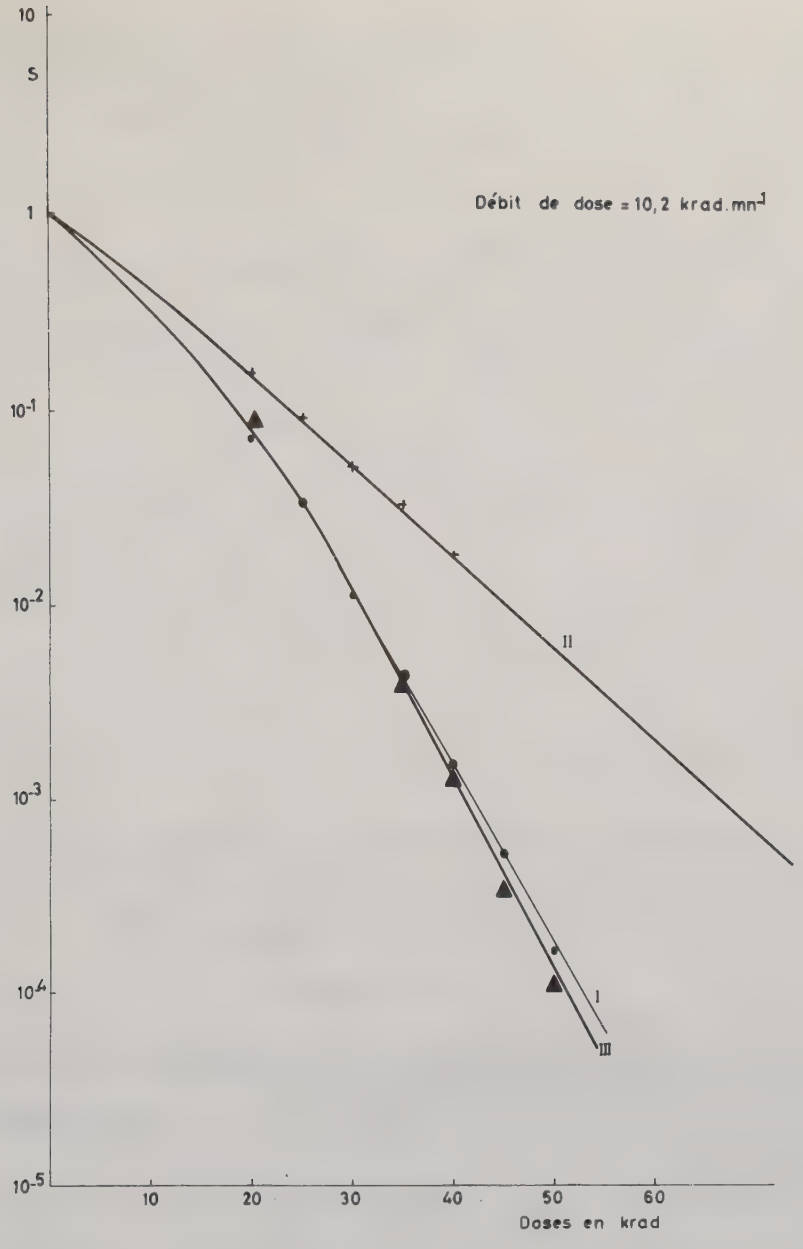


Fig. III.3 – Influence du traitement des échantillons sur les résultats d'irradiation.
Mise en évidence de la nécessité d'assurer un barbotage de gaz pendant le temps d'attente qui s'étend entre le prélèvement dans la culture et le moment de l'irradiation.
– courbe I : temps d'attente entre 15 et 45 mn ;
– courbe II : " " de 90 à 120 mn sans barbotage ;
– courbe III : " " de 90 à 120 mn avec " .

D'ailleurs, si l'on réalise une irradiation sous anoxie obtenue par barbotage, durant 5 mn avant l'irradiation, d'azote R fourni par l'AIR LIQUIDE (teneur en O_2 inférieure à 10 ppm en volume) – anoxie contrôlée sur le courant gazeux par la cellule de HERSCH – on retrouve l'effet bien connu de la protection par manque d'oxygène (fig. III.4 : dans cette expérience, pour les courbes en milieu oxygéné et les courbes en milieu sans oxygène, n prend respectivement les valeurs : 4,8 et 4,6 ; Do ; 4,8 et 9,5 ; Dq : 8 et 14,2). Dans une expérience similaire, n est passé de 7 à 2,6, Do de 4,8 à 11,1 et Dq de 9,2 à 11,2.

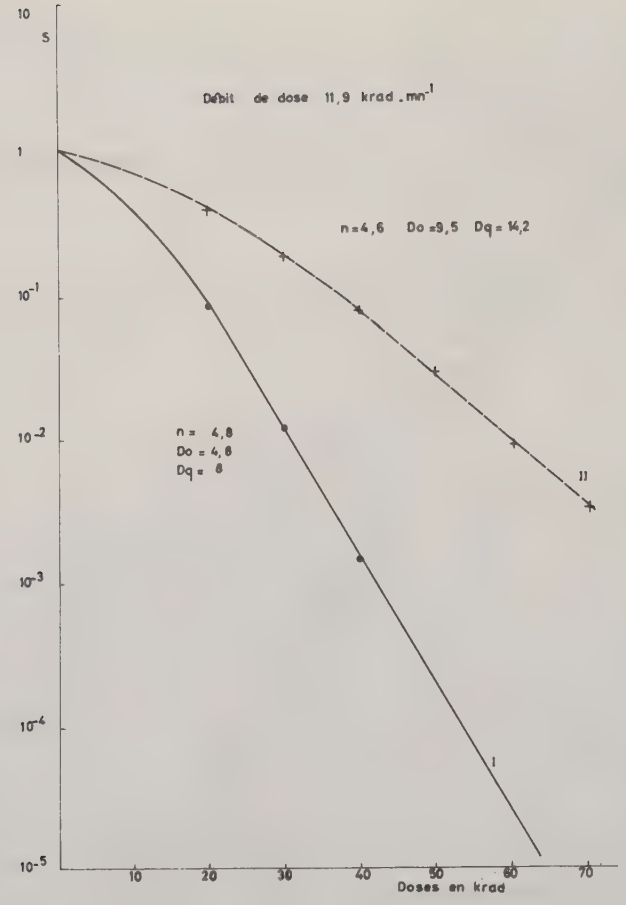


Fig. III.4 – Effet de l'anoxie.
Courbes effectuées au même moment sur la même culture :
I en milieu oxygéné ;
II en milieu sans oxygène.

TABLEAU III.4

N° des courbes	Temps d'attente (en mn) du		Barbotage de gaz	n	Do	Dq
	1er échant. irradié	Dernier échant. irradié				
1	15	45	sans	6,5	4,8	8,8
2	90	120	sans	1,8	9,3	2,8
3	90	120	avec	9,5	4,4	10,4

3 – Effets du débit de dose

Dans certaines limites, l'augmentation du débit de dose se traduit par une radiosensibilité plus importante. Parmi les travaux consacrés à cette question, nous retiendrons, dans les plus récents, ceux de DAVIES et THORBURN (1968) portant sur Chlamydomonas, ceux de Mc CRORY et GRUN (1969) portant sur des racines de plantes supérieures, ceux de BATEMAN (1968) consacrés à des cellules de mammifères.

L'effet est très net chez les Chlorelles lorsque l'on passe d'un débit inférieur ou égal à 2,5 krad.mn^{-1} à un débit de l'ordre de 10 krad.mn^{-1} et n'est pas sensible lorsqu'on augmente le débit de dose au-dessus de cette valeur, quand l'irradiation a lieu à 25°C. La figure III.5 et le tableau III.5 illustrent l'effet du débit de dose sur la radiosensibilité. La figure III.6 montre que la radiosensibilité apparente ne croît plus au-dessus d'un débit de 10 krad.mn^{-1}. Il faut souligner le fait que le matériel vivant n'a pratiquement pas évolué pendant les expériences ; échantillons provenant de cultures en masse au plateau de croissance ; irradiations effectuées à l'obscurité et 25°C durant au maximum 120 mn ; effet d'anoxie évité par un barbotage du mélange air-CO_2 durant l'irradiation.

TABLEAU III.5

N° des courbes	Débit de dose en krad.mn^{-1}	n	Do	Dq
1	0,8	6	6	10
2	2,5	9,5	5,6	12
3	11	14	4,8	12,8

Le tableau III.6 regroupe les valeurs obtenues en comparant, sur des cultures en masse, l'effet de deux débits de dose, 0,8 et 11,3 krad.mn^{-1} ; il confirme les résultats exposés ci-dessus.

TABLEAU III.6

N° d'expérience	Débit de dose 11,3 krad.mn^{-1}		Débit de dose 0,8 krad.mn^{-1}	
	n	Do	n	Do
1	12,5	3,8	4,4	4,8
2	13	3,8	3	6
3	14,5	2,7	3	4,6
4	15	3	3	4,6

Pour les Chlorelles, il faut donc distinguer, dans le cas d'irradiations effectuées à 25°C, les irradiations aiguës qui ont lieu à un débit de dose d'environ 10 krad.mn^{-1} et plus, des irradiations subaiguës qui ont lieu à un débit de dose inférieur ou égal à 2,5 krad.mn^{-1}.

Figure III.5 : Influence du débit de dose sur les courbes de survie. Ces courbes portent sur la même population d'algues (culture de 14 jours) ; l'état d'anoxie est évité ; les durées d'irradiation (en mn) sont données dans le tableau suivant :

Doses	Courbe à 0,8 krad.mn^{-1}	Courbe à 2,5 krad.mn^{-1}	Courbe à 11 krad.mn^{-1}
20	25	8	1,82
30	37,50	12	2,73
40	50	16	3,63
50	62,5	20	4,55
60	75	24	5,46
70	87,50	28	6,36

Figure III.6 : Effet du débit de dose sur les courbes de survie :
I : courbe obtenue avec un débit de dose de 23,6 krad.mn^{-1} ;
II : courbe obtenue avec un débit de dose de 11,5 krad.mn^{-1} .
(Expérience portant sur une culture de 6 jours).

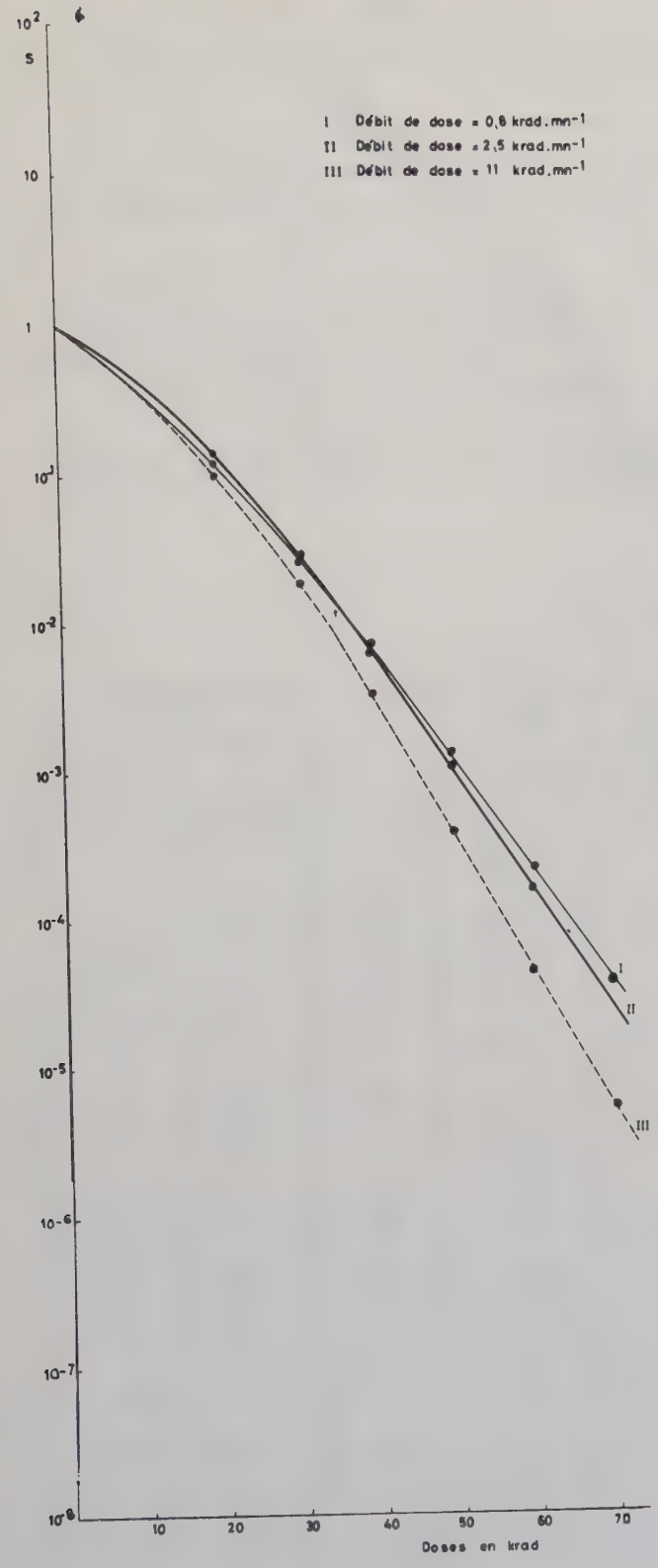


Fig. III.5

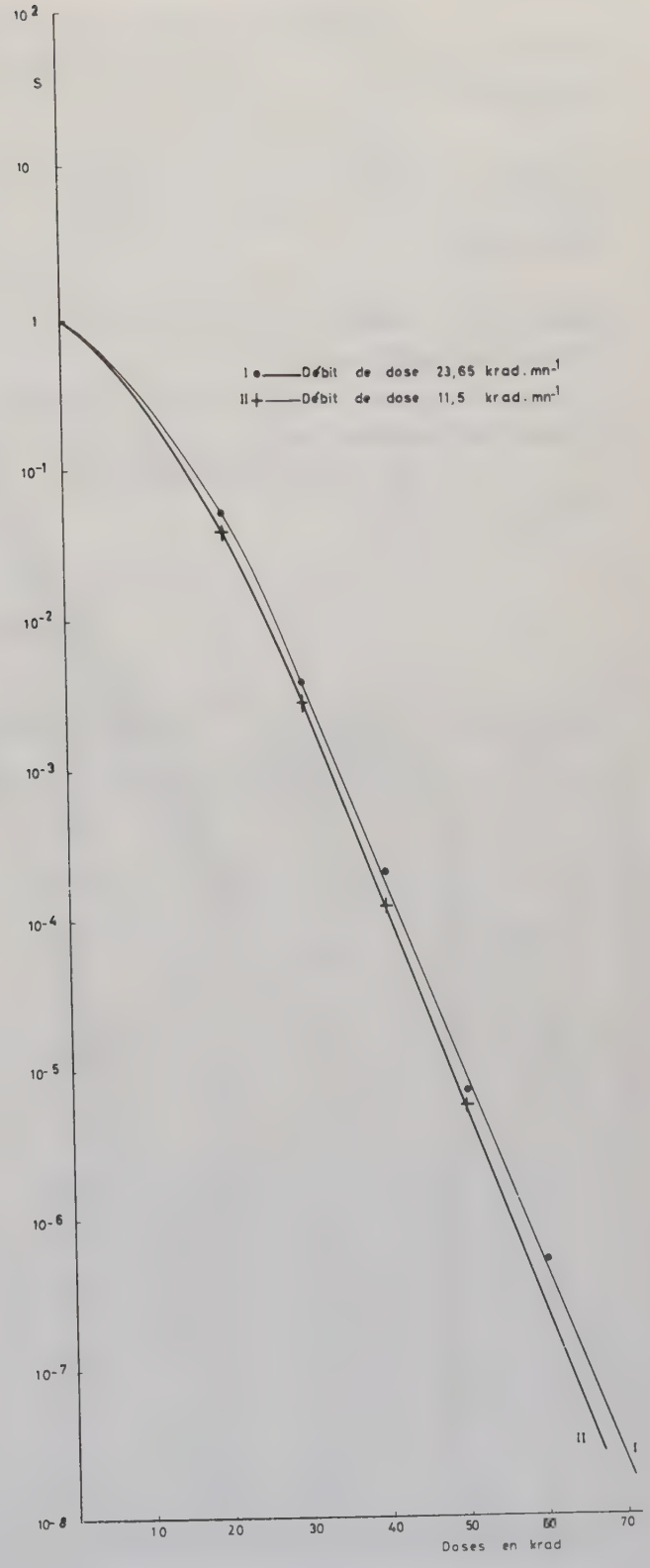


Fig. III.6

B - RESULTATS OBTENUS EN IRRADIATIONS AIGUËS

1 - Courbes obtenues avec des échantillons prélevés dans des cultures en masse au plateau de croissance

Les résultats obtenus avec 40 cultures, définies comme étant au plateau de croissance vis-à-vis de la densité cellulaire, font apparaître de grandes variations entre les courbes de survie : n varie de 2 à 30 ; Do s'étend de 3 à 6.

On doit donc conclure que, dans le cas de ces irradiations, les critères qui définissent ces populations sont insuffisants. Mais il est arrivé qu'une même culture soit utilisée à divers intervalles de temps ; les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans le tableau III.7.

Dans ce tableau, on constate qu'il y a des différences d'état d'une culture à l'autre ; par exemple, 9 jours après l'ensemencement, la densité cellulaire est de 129.10^6 cellules par millilitre pour la culture H et de 260.10^6 cellules par millilitre pour la culture C ; 7 jours après l'ensemencement, la densité cellulaire est de 120, 175, 200, 240.10^6 cellules par millilitre respectivement pour les cultures H, B, D ou F.

Les différences entre les taux de clonage pour des cultures de même âge ne sont pas significatives.

TABLEAU III.7

Désignation de la culture	Nombre de jours après ensemencement	Densité cellulaire en 10^6 cellules.ml^{-1}	Taux de clonage	n	Do	Dq
A	9	217	0,88			
	14	255	0,62			
B	7	175	0,96	7	4,7	9,2
	10	190	0,88	4,6	5,7	8,4
C	6	210	0,94	2,5	3,2	10,8
	9	260	0,86	6,1	4,7	8,4
D	7	200	0,94	17,5	3,2	9,6
	10	256	0,86	5	4,9	8
E	8	210	0,91	14	3,9	10,4
	14	230	0,75	13	4,6	11,6
F	7	240	0,87	6,5	4,2	8,4
	14	244	0,84	5	5,2	8
G	7	143	0,69	9,5	4,4	10
	9	131	0,71	12	4,6	10,8
H	7	120	0,69	10	4,6	10,8
	9	129	0,71	11	4,7	10,8

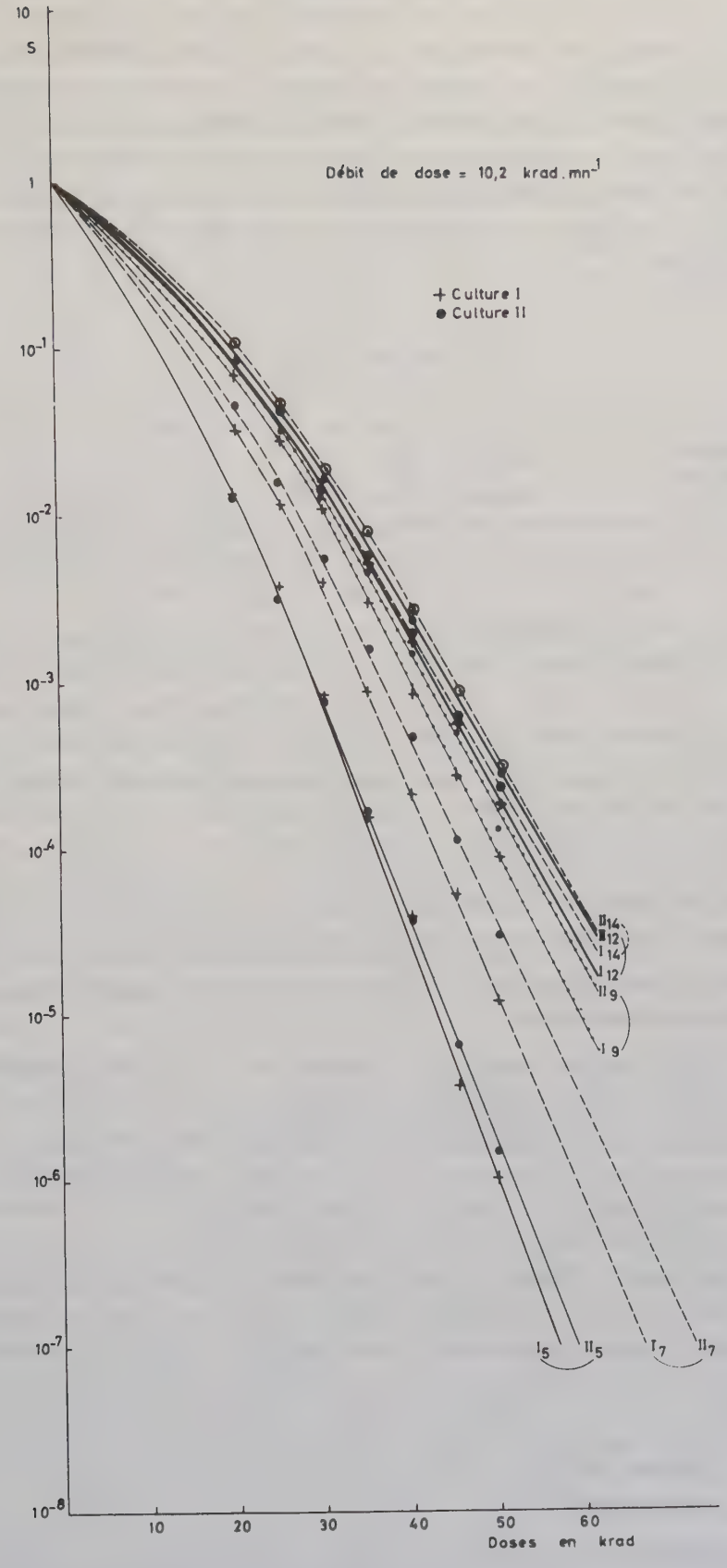


Fig. III.7 : Influence de l'âge de la culture sur la radiosensibilité. I et II représentent deux cultures différentes ; les indices 5, 7 9, 12, 14 désignent l'âge en jours des cultures I et II.

Pour une même culture, la radiosensibilité diminue quand l'âge de la culture s'accroît, avec, pour la courbe de survie, variation à la fois de n et de Do.

Sur ce point, les Chlorelles n'ont pas le même comportement que les cellules Hela qui sont plus radiosensibles en "phase stationnaire" que durant la phase exponentielle de croissance (BERRY, HALL, CAVANAGH, 1970). L'expérience suivante (tableau III.8 et figure III.7) confirme que la radiosensibilité diminue quand la culture vieillit : 2 cultures A et B, ensemencées au même moment de la même façon, évoluent dans des conditions aussi voisines que possible ; on opère des prélèvements pour tracer des courbes de survie à divers intervalles de temps.

TABLEAU III.8

Age de la culture en jours	Densité cellulaire en 10^6 cell.ml^{-1}		Taux de clonage		pH		A		B	
	A	B	A	B	A	B	n	Do	n	Do
5	20,4	30,4	-	-	6,05	6,2	20	3	18	3,2
7	138	137	0,80	0,87	6,85	6,9	20	3,5	14	3,8
9	185	159	0,77	0,89	7,1	7,1	16	4,2	14	4,5
12	196	166	0,73	0,77	7,2	7,3	15	4,5	13	4,8
14	175	153	0,80	0,74	-	-	11	4,8	15	4,7

De plus, on remarque que :

- au 7e jour, les cultures sont encore en évolution et les différences de radiosensibilité entre les cultures A et B sont plus importantes qu'au 5e jour ou plus tard ;
- le taux de clonage fluctue d'un jour à l'autre et entre eux ces taux de clonage ne sont pas significativement différents ;
- les variations de pH sont un reflet de l'évolution de la population mais ne peuvent pas être rapprochées des variations de radiosensibilité puisque les populations de deux cultures de même pH peuvent présenter une radiosensibilité différente.

Les causes de la diminution de la radiosensibilité des Chlorelles lorsque l'âge des cultures en masse augmente ne sont pas encore connues.

Les variations importantes de radiosensibilité pour des cultures en masse utilisées 6 à 9 jours après l'ensemencement autorisent à penser que la présence de cellules à un stade donné, même avec une fréquence faible, modifie la radiosensibilité apparente de la population à laquelle elles appartiennent. C'est pourquoi nous avons étudié la radiosensibilité des Chlorelles au cours du cycle cellulaire à l'aide de cultures synchronisées.

2 – Courbes obtenues à partir d'échantillons prélevés dans des cultures synchronisées

Le tableau III.9 groupe les résultats obtenus à divers moments d'un même cycle pour plusieurs cultures synchronisées désignées par les lettres A, B, C, D, E :

TABLEAU III.9

Moment du cycle défini en heures après le début de la phase de lumière	A			B			C			D			E		
	n	Do	Dq	n	Do	Dq	n	Do	Dq	n	Do	Dq	n	Do	Dq
0	18	3,3	10	30	3	10,4				80	2,8	12,8			
3	19	3,2	9,6	36	2,7	9,6	34	2,7	9,2	80	2,8	12,8			
6										10	3,1	7,6	3	3,4	3,2
9	9,5	3,7	8,4	8	3,1	6	14	2,9	8	12	3	8	7	2,8	6
12							32	2,5	9,2				2	3,5	2,4
15													2	3,8	2,4
18 *													4,8	3,4	4,8

* soit 2 heures de la phase obscurité.

Les valeurs de Do sont faibles. Or, pour les valeurs de Do faibles et pour un même Dq, une toute petite variation de Do entraîne une grande variation de n ; la précision sur n est moins bonne quand Do est faible.

Les valeurs de Do sont inférieures ou égales aux valeurs les plus faibles trouvées pour les courbes obtenues avec des cultures en masse. Les populations de Chlorelles synchronisées apparaissent comme plus radiosensibles que les populations de cultures en masse au plateau de croissance (cellules au stade Go). Ceci est vrai même pour le stade G'o (voir chapitre II, A, b cultures synchronisées) alors que la quantité d'ADN par cellule est la même pour G'o et Go.

Les cellules des cultures synchronisées ont la radiosensibilité des populations des cultures en masse lorsque ces dernières sont en croissance active. Il serait donc intéressant de laisser à l'obscurité des cellules en G'o et de suivre l'évolution de leur radiosensibilité au cours du temps.

Les variations de Do au cours d'un cycle d'une culture donnée sont significatives, mais elles ne sont pas plus importantes que celles obtenues d'une culture à une autre pour un même moment du cycle.

Cependant, le faisceau des courbes de survie obtenu avec des cultures synchronisées est beaucoup plus étroit que celui obtenu avec des cultures en masse. Ceci provient du fait que l'état des populations (composition, état physiologique) est plus reproductible dans les cultures synchronisées que dans nos cultures en masse, surtout lorsque ces dernières n'ont pas atteint l'âge de 9 jours.

Durant les premières heures de la phase de lumière, la radiosensibilité apparaît comme constante. Elle diminue au début de la phase S. Comme il est difficile de se représenter les variations des courbes dépendant de 2 paramètres variables, nous avons illustré ce fait par la fig. III.8.

Ce résultat rejoint ceux d'ALTMANN et coll. (1968) obtenus sur Chlorella, ceux de DAVIES (1966) et de CĚCHÁČEK et HILLOVA (1970) sur Chlamydomonas, ceux ceux de LEGRYS et HALL (1969) sur les cellules de mammifères et de FRINDEL (1966) qui résume les résultats antérieurs acquis sur les cellules de mammifères.

Il faut souligner qu'à deux heures de la phase d'obscurité, où une fraction des cellules possède plusieurs noyaux, et où les cellules ont synthétisé une grande quantité d'acide désoxyribonucléique du noyau, la radiosensibilité est à peine plus faible qu'au début du cycle. Cette question importante mérite d'être approfondie et fera l'objet de recherches ultérieures. Dès à présent on peut rapprocher le résultat obtenu de ceux obtenus sur des oeufs d'insectes en cours de développement. Pour ces oeufs, il y a synchronisation des divisions et la radiosensibilité dépend du stade cellulaire et non du nombre de cellules (MURAKAMI, TEULADE, 1969).

Nous n'avons pas encore tracé les courbes de survie pour des populations synchronisées plus avancées dans la phase d'obscurité en raison de l'évolution rapide du nombre des cellules due à la libération d'autospores durant les manipulations entre l'irradiation et l'ensemencement. Une température de 0°C permettrait de bloquer l'évolution des populations : les premières indications des effets de cette température sur les populations de Chlorelles synchronisées se trouvent dans le travail de MUNTZ (1969).

En résumé, les variations de radiosensibilité des Chlorelles en fonction du cycle sont peu nettes par rapport à celles de nombreuses autres cellules. Mais il ne faut pas argumenter à partir de ce résultat tant que la durée de la (ou des) phase S ne sera pas connue au niveau de l'individu.

3 – Etude des phénomènes de restauration chez les Chlorelles

a) Généralités

L'existence de l'épaulement des courbes de survie tracées en coordonnées semi-logarithmiques suggère que, après irradiation, certaines lésions sublétales n'empêchent pas la multiplication cellulaire. Celle-ci peut s'opérer en présence de ces lésions ou après leur réparation. Par contre, leur accumulation provoque l'arrêt de la multiplication cellulaire.

La mise en évidence des processus de réparation et leur étude reposent principalement sur des expériences de fractionnement de doses. On compare le taux de survie Sc obtenu après une dose unique avec le taux de survie Sf obtenu pour la même dose totale de rayonnement mais donnée en deux — ou plusieurs – fois, les diverses doses étant séparées par des délais appelés ici intervalles de repos. Si l'état des cellules ne se modifiait pas durant les intervalles de repos, les taux de survie Sc et Sf seraient égaux. L'état des cellules peut se modifier parce qu'il y a eu réparation des lésions sublétales, ou parce qu'il y a eu progression dans le cycle cellulaire, et il faut bien séparer ces deux types de phénomènes dans l'interprétation des résultats.

Ce n'est qu'après des études de fractionnement de doses que l'on peut essayer d'aborder l'étude du mécanisme de la restauration.

C'est par la méthode de fractionnement des doses que les processus de restauration ont été mis en évidence chez les cellules de Mammifères cultivées in vitro. ELKIND (1967) donne une étude complète pour ces cellules, étude reprise par LANGE (1970) qui a tenté de séparer les effets de la restauration de ceux de la progression dans le cycle cellulaire. ALPER, HOWARD, et KIEFER (1969) ont discuté tous les termes employés par les auteurs anglo-saxons pour désigner ce type de processus : "recovery" serait à prohiber en raison de son emploi par les radiochimistes, de même que "intracellular recovery" et "repair", parce qu'ils supposent l'existence de mécanismes non encore démontrés. Toute réduction des effets d'une dose totale de rayonnement, soit par fractionnement, soit par

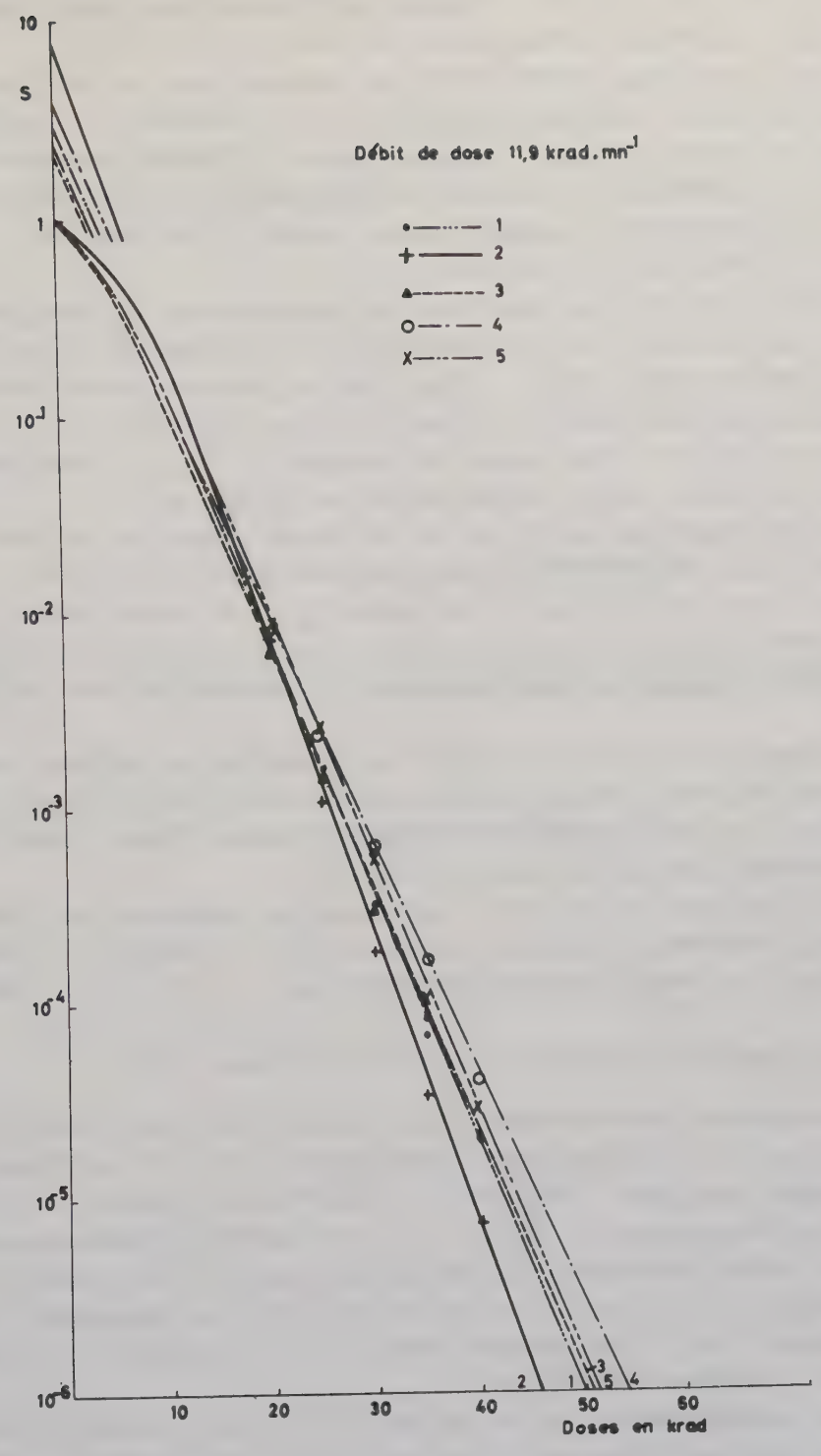


Fig. III.8 : Variation de la radiosensibilité au cours d'un cycle d'une même culture synchronisée (irradiation aiguë).
Courbes obtenues avec des échantillons prélevés :

1/ après 6 heures de lumière ;
2/ " 9 " " ;
3/ " 12 " " ;
4/ " 15 " " ;
5/ " 2 " d'obscurité.

diminution du débit de dose, devrait être appelée "sparing".

Ici, nous désignons par restauration l'élimination au niveau de la cellule irradiée de lésions sublétales créées par l'irradiation.

On trouvera dans SILINI (1967) les mises au point de SETLOW pour la restauration de dommages moléculaires causés aux acides nucléiques, de KOROGODIN pour la restauration des lésions provoquées chez les levures, d'ELKIND qui traite des cellules de mammifères, de HORNSEY qui s'attache aux phénomènes de restauration dans les tissus. Des résultats plus récents sont regroupés dans le volume 12 de "Advances in Biological and Medical Physics" (LAWRENCE et GOFMAN, 1968).

Dans ce travail, les expériences de fractionnement de dose ont été souvent conduites de la façon suivante : on a comparé à une courbe obtenue en irradiation non fractionnée avec les doses Dc_1, Dc_2, ... Dc_i, une ou plusieurs courbes obtenues en donnant aux échantillons une première dose D_1 et, après un temps de repos T, des doses d_1, d_2, ... d_i complémentaires. On a fait varier les grandeurs D_i, T, d_i et les conditions qui s'exerçaient sur les algues durant l'application de ces grandeurs.

Nous désignerons par Sc un taux de survie obtenu pour une dose donnée en une fois, par Sf un taux de survie obtenu pour une dose donnée en deux fois. Une courbe obtenue avec des doses non fractionnées sera notée C_c et une courbe obtenue avec des doses fractionnées en deux, Cf. Les paramètres de Cf seront calculés après la translation des axes de coordonnées qui amène le taux de survie 1 à la valeur du taux de survie S_{D_1} (figure III.9).

Comme nous avons travaillé sur des populations de cellules, nous avons choisi la durée du temps de repos T et les conditions d'expérience pour qu'il n'y ait pas de libération d'autospores, donc d'augmentation du nombre d'individus entre le début de D_1 et la fin de l'ensemencement des cellules après les doses d_1.

Sauf indication contraire, les expériences ont porté sur des cultures en masse, à leur plateau de croissance, et elles ont eu lieu à 25°C, à l'obscurité, et en milieu bien aéré par barbotage d'un mélange gazeux (en volume, air : 96 %, CO_2 : 4 %).

b) Les processus de restauration en fonction du temps T

La figure III.10 et le tableau III.10 donnent les valeurs de Sf en fonction de T pour une même dose D_1 de 20 krad et des doses d_i de 10, 20, 30 ou 40 krad. Au temps 0, on a porté la valeur de Sc pour la dose non fractionnée de la valeur $(D_1 + d_i)$.

Pour chaque temps T, la dose D_1 a été donnée à un échantillon unique, réparti après le repos en autant de sous-échantillons que de doses d_i. Il en résulte qu'on évite, d'un échantillon à l'autre, l'erreur portant sur la dose D_1, mais que les temps T ne sont définis qu'à quelques minutes près. C'est pourquoi, dans ce type d'expérience, on n'a pas étudié l'effet des temps T inférieurs à 30 minutes.

En raison du nombre de manipulations sur chaque échantillon, la précision des résultats dans des expériences de ce type est moindre que dans les expériences conduisant aux courbes de survie sans fractionnement des doses. Les valeurs portées sur les lignes du tableau correspondant à $d_i = 0$ permettent de se faire une idée des erreurs commises et les résultats doivent être interprétés en tenant compte de ces erreurs.

De l'étude du tableau III.10 il se dégage alors deux résultats : les processus de restauration interviennent rapidement et atteignent leur importance maximum en quelques heures. On retrouve là des résultats obtenus chez Chlamydomonas par DAVIES (1966), HILLOVA et DRASIL (1967) et BRYANT (1969).

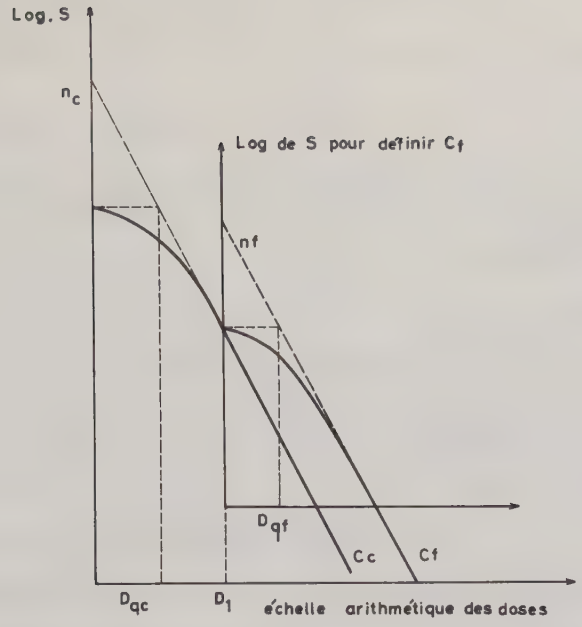


Fig. III.9 – Définition des paramètres utilisés pour décrire les courbes obtenues dans les expériences de fractionnement de doses.

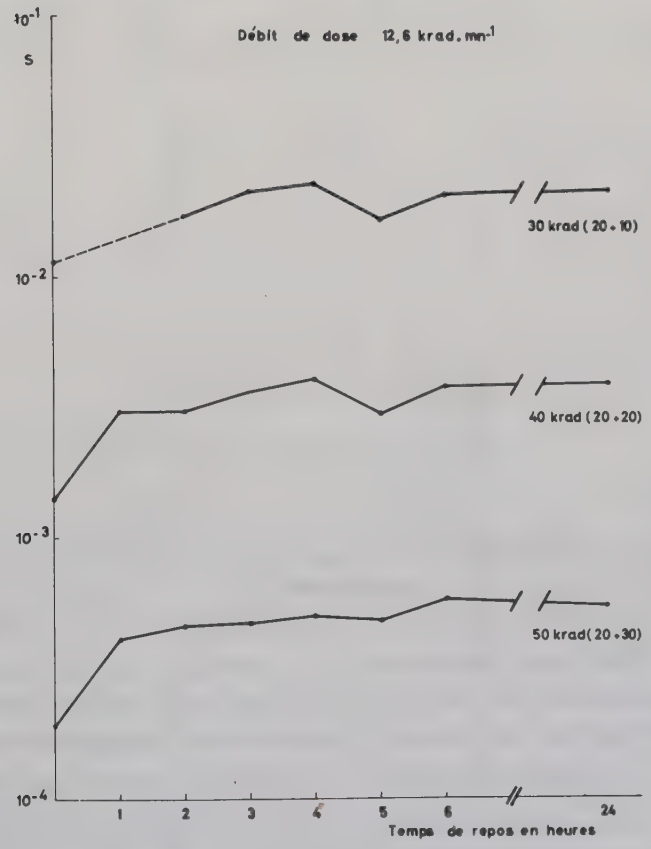


Fig. III.10 – Mise en évidence de la restauration en fonction du temps de repos T.

Pour les temps T = 0, on a porté les valeurs Sc, et pour les autres temps, les valeurs Sf.

TABLEAU III. 10

Valeurs de Sc ou Sf pour divers temps T en heures

D_1	d_i	$D_1 + d_i$	T = 0 Sc	T = 0,5	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 5	T = 6	T = 24
20	0	20	$8,36.10^{-2}$		$8,24.10^{-2}$	$7,62.10^{-2}$	$9,2\ .10^{-2}$	$8,37.10^{-2}$	$6,38.10^{-2}$	$7,65.10^{-2}$	$6,91.10^{-2}$
20	10	30	$1,14.10^{-2}$			$1,69.10^{-2}$	$2,1\ .10^{-2}$	$2,25.10^{-2}$	$1,65.10^{-2}$	$2,03.10^{-2}$	$2,13.10^{-2}$
20	20	40	$1,4\ .10^{-3}$		$3,04.10^{-3}$	$3,06.10^{-3}$	$3,6\ .10^{-3}$	4.10^{-3}	3.10^{-3}	$3,8\ .10^{-3}$	$3,9\ .10^{-3}$
20	30	50	$1,9\ .10^{-4}$		$4,1\ .10^{-4}$	$4,6\ .10^{-4}$	$4,7\ .10^{-4}$	5.10^{-4}	$4,8\ .10^{-4}$	$5,8\ .10^{-4}$	$5,5\ .10^{-4}$
20	20	40	$4,2\ .10^{-3}$	$5,3.10^{-3}$			$9,4\ .10^{-3}$				
20	30	50	$4,5\ .10^{-4}$	$6,6.10^{-4}$			$1,37.10^{-3}$				
20	40	60	$4,9\ .10^{-5}$	$3,2.10^{-5}$			$1,66.10^{-4}$				
20	0	20	$4,3\ .10^{-2}$		$3,9\ .10^{-2}$		$4,45.10^{-2}$				
20	10	30	$4,3\ .10^{-3}$	7.10^{-3}	$6\ .10^{-3}$		$9,6\ .10^{-3}$				
20	20	40	$2,9\ .10^{-4}$	$6,5\ .10^{-4}$	$8,7\ .10^{-4}$		$1,14.10^{-3}$				
20	30	50	$2\ .10^{-5}$	$1,9\ .10^{-5}$	$7,8\ .10^{-5}$		1.10^{-4}				
20	0	20		$1,2\ .10^{-1}$			$1,2\ .10^{-1}$				
20	10	30	$2,1\ .10^{-2}$	$3,3\ .10^{-2}$			$3,5\ .10^{-2}$				
20	20	40	$3,1\ .10^{-3}$	$6,3\ .10^{-3}$			$9,6\ .10^{-3}$				
20	25	45		$1,9\ .10^{-3}$			$4,2\ .10^{-3}$				
20	30	50	$3,3\ .10^{-4}$	$7,6\ .10^{-4}$			$1,5\ .10^{-3}$				
20	35	55		$3,3\ .10^{-4}$			$5,9\ .10^{-4}$				
20	40	60	$4,2\ .10^{-5}$	$9,6\ .10^{-5}$							
20	0	20			$3,43.10^{-2}$		$3,88.10^{-2}$				
20	10	30		$3,2\ .10^{-3}$	$3,7\ .10^{-3}$		$5,3\ .10^{-3}$				$5,5\ .10^{-3}$
20	20	40		$1,7\ .10^{-4}$			$3,9\ .10^{-4}$				$4,8\ .10^{-4}$
20	25	45		$6,6\ .10^{-5}$	$6,9\ .10^{-5}$		$8,2\ .10^{-5}$				$8,6\ .10^{-5}$
20	30	50		$1,7\ .10^{-5}$	$1,3\ .10^{-5}$		$1,7\ .10^{-5}$				$2\ .10^{-5}$

Par fractionnement des doses, on étudie l'étendue de la restauration dans une population. On ne peut pas actuellement en tirer des enseignements sur ce qui se passe à l'échelle de la cellule, soit restauration progressive dans chaque cellule des lésions sublétales, hypothèse la plus vraisemblable, soit réparation, à un moment précis pour chaque cellule, de toutes les lésions sublétales.

Nous avons tenté une étude plus fine de la cinétique de la restauration durant la première heure qui suit l'irradiation D_1. Les résultats très dispersés, ne permettent pas de tirer des conclusions solides. De telles fluctuations se retrouvent dans un travail de BACCHETTI et coll. (1966) portant sur des levures.

Ces fluctuations s'expliquent par le fait que, pour des temps de repos faibles, Sf et Sc sont très voisins et sont entachés d'erreurs de l'ordre de grandeur de (Sf - Sc). Cette étude devrait être reprise avec la méthode des fractionnements multiples où l'on étudierait $(Sf - Sc)_t \times m$, t étant le temps de repos étudié et m le nombre de fractions prenant les valeurs 3, 4 ou 5.

TABLEAU III.11

Valeurs de Sc ou de Sf pour divers T en mn

D_1	d_i	D_1+d_i	T = 0 Sc	T = 5	T = 10	T = 20	T = 30	T = 40	T = 60	T = 180
20	10	30	$4,3.10^{-3}$	$5,7.10^{-3}$	$5,5.10^{-3}$	$8,2.10^{-3}$	$7 .10^{-3}$		$6 .10^{-3}$	$9,6.10^{-3}$
20	20	40	$2,9.10^{-4}$	$3,5.10^{-4}$	$5,2.10^{-4}$	$1,1.10^{-3}$	$6,5.10^{-4}$		$8,7.10^{-4}$	$1,14.10^{-3}$
20	30	50	$2 .10^{-5}$	$3,1.10^{-5}$		$6,7.10^{-5}$	$1,9.10^{-5}$		$7,8.10^{-5}$	$1 .10^{-4}$
20	10	30	$9,9.10^{-3}$	$1 .10^{-2}$	$1,2.10^{-2}$	$1,6.10^{-2}$	$1,1.10^{-2}$		$9,3.10^{-3}$	$1,9.10^{-2}$
20	20	40	$1,2.10^{-3}$	$1,1.10^{-3}$	$1,8.10^{-3}$	$3,6.10^{-3}$	$1,3.10^{-3}$		$1,6.10^{-3}$	$3,3.10^{-3}$
20	30	50	$1,3.10^{-4}$	$1,4.10^{-4}$	$1,5.10^{-4}$	$1,5.10^{-4}$	$1,7.10^{-4}$		$1,6.10^{-4}$	$4,1.10^{-4}$
20	20	40	$4,2.10^{-3}$		$4,1.10^{-3}$	$2,9.10^{-3}$	$5,3.10^{-3}$	$3,2.10^{-3}$		$9,4.10^{-3}$
20	30	50	$4,5.10^{-4}$		$3,5.10^{-4}$	$2,2.10^{-4}$	$6,6.10^{-4}$	$1,2.10^{-3}$		$1,4.10^{-3}$

Dans la suite du travail, nous avons voulu expérimenter dans le cas de la restauration maximum : T a été choisi égal à 3 heures.

c) Les processus de restauration en fonction de la dose D_1

Cette étude a été réalisée avec des cultures en masse à leur plateau de croissance. Depuis leur prélèvement et jusqu'à leur ensemencement, les échantillons ont été conservés à 25°C, à l'obscurité et sous barbotage du mélange (air-CO_2) même durant les irradiations. Le temps T a été choisi égal à 3 heures.

La figure III.11 et le tableau III.12 présentent les résultats obtenus.

Les caractéristiques essentielles des processus de restauration chez les Chlorelles ressortent de ce tableau. Tout d'abord, la pente de la partie exponentielle est la même sur la courbe Cc que sur les courbes Cf correspondantes. Ce résultat, qui se retrouve chez les cellules de mammifères, diffère de ceux qu'HILLOVA et DRASIL (1967) ont donnés pour Chlamydomonas. Mais, au cours de l'expérimentation de ces deux auteurs, il y a eu peut-être un effet d'anoxie lors de la deuxième irradiation. Nous avons constaté cet effet dans des expériences non rapportées ici, où le temps T du repos s'était déroulé

TABLEAU III. 12

(D_1 en krad)

Désignation de la culture	Paramètre de Sc			D_1 = 10			D_1 = 20			D_1 = 30			D_1 = 40		
	n	Do	Dq	n	Do	Dq	n	Do	Dq	n	Do	Dq	n	Do	Dq
A	14	3,9	10,4	10	3,9	8,8	9	4	8,4	6	4	8	5,5	4	6
B	18	3,9	11,6				3,9	4	5,2				2	4	2,8
C	10	4	9,2				5,5	4,4	6,8				3,2	4	4,8
D	7	4,8	7,2				2,8	4,8	5,2						
E	12	4,2	10				6	4,2	7,2						
F	39	4,5	16				8	4,7	9,2						
G	12	4,8	12				3,6	5,3	6,8						
H	4,6	5,7	8,4				1,9	6	3,6						
I	6	4,7	8				2	5,3	3,6						

sans barbotage du mélange air-CO_2 dans les échantillons. DAVIES (1966), sur Chlamydomonas, trouve des résultats semblables aux nôtres.

La restauration n'est pas totale chez les Chlorelles et l'épaulement de la courbe Cf est moins important que celui de la courbe Cc, ce qui se traduit par une diminution de n et de Dq quand on passe de Cc à Cf. Pour une même valeur de D_1, les rapports de ces valeurs entre elles $\frac{nf}{nc}$ et $\frac{Dqf}{Dqc}$ ne sont pas constants d'une expérience à l'autre, mais ils sont entachés de fortes erreurs et peuvent dépendre de l'état de la culture au moment du prélèvement des échantillons, si l'on se rapporte à l'étude de la radiosensibilité en fonction de l'âge de la culture.

Une restauration non totale a déjà été constatée par DEERING (1968) sur le champignon Dictyostelium. Chez Chlamydomonas, HILLOVA et DRASIL (1967) obtiennent une restauration totale, tandis que DAVIES (1966) observe des fluctuations importantes de nf en fonction de T pour les courbes Cf. Chez les cellules de mammifères, les résultats sont plus délicats à interpréter en raison de l'interaction de 2 types de processus : le processus de restauration d'une part, et le processus de modification de la radiosensibilité en fonction du cycle cellulaire qui se poursuit pendant le temps T, d'autre part (voir ELKIND dans SILINI, 1967).

Le fait que la restauration ne soit pas totale peut s'expliquer de deux façons :

1) la capacité de la restauration est limitée ;
2) il existe des lésions non réparables ;

les expériences de fractionnements multiples permettent de répondre à ces questions.

d) Fractionnements répétés

La figure III. 12 permet de comparer 3 courbes obtenues au même moment sur la même culture :

- une courbe Cc ;

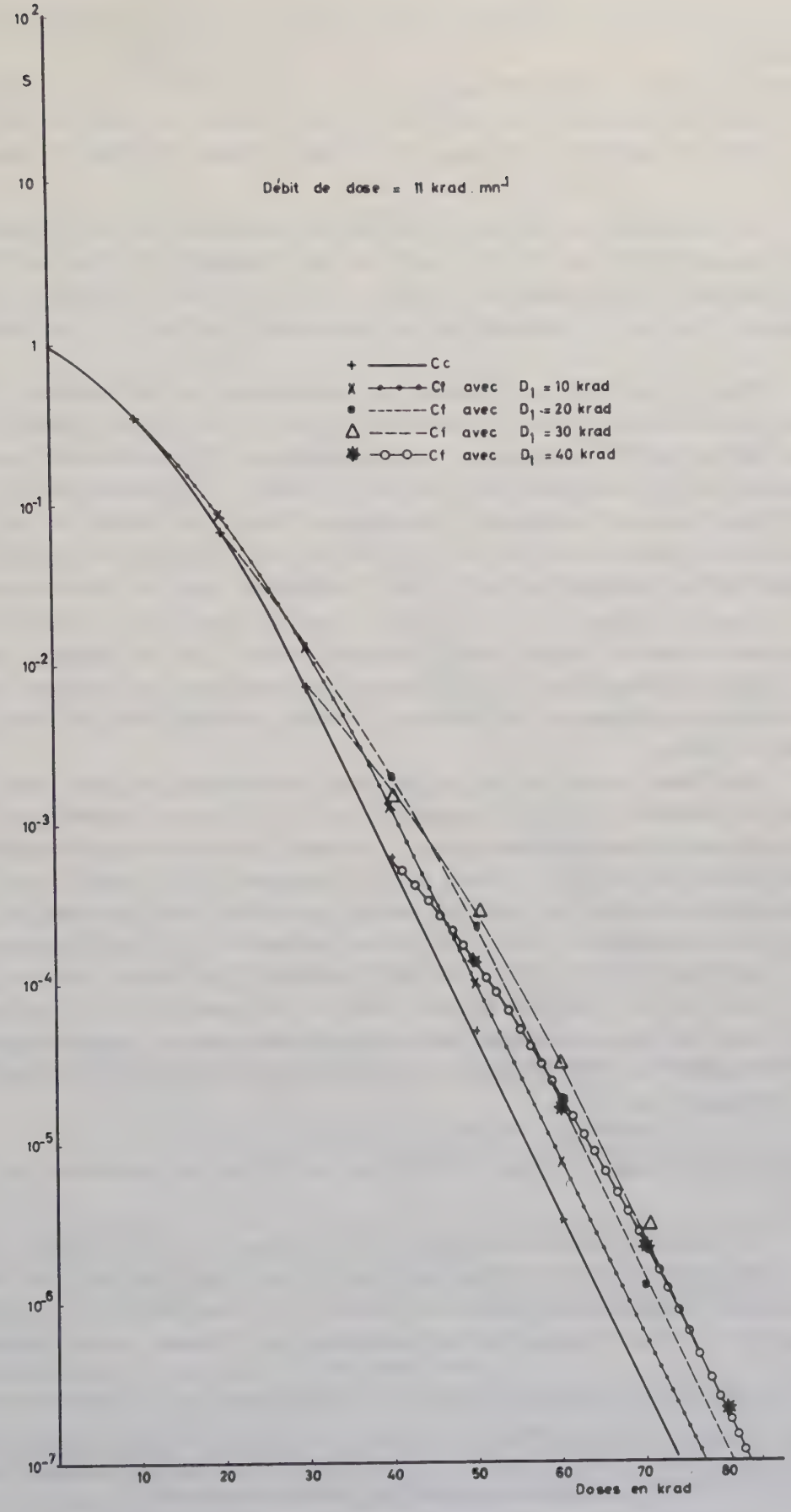


Fig. III.11 – Influence de la dose D_1 sur les courbes Cf.

- une courbe Cf_1 obtenue avec une dose D_1 de 20 krad, un temps de repos T de 3 heures et des doses d_i ;
- une courbe Cf_2 tracée à partir d'échantillons qui ont reçu une dose D_1 de 20 krad, un temps de repos de 3 heures, reçu une dose D'_1 de 20 krad, un temps de repos de 3 heures, reçu une dose D'_1 de 20 krad, un temps de repos de 3 heures, reçu les doses d_i.

On remarque que les pentes des parties exponentielles des courbes Cc, Cf_1, Cf_2 sont très voisines (Do = 4,9 ; 4,8 ; 4,8), et que n passe de 7,5 pour Cc à 2,4 et 2,3 pour les courbes Cf (Dq prenant les valeurs 9,2, 4 et 4). Cette expérience prouve qu'après 3 heures, bien que la restauration soit maximum, la capacité de restauration n'est pas épuisée.

Afin de confirmer ce résultat, des expériences ont été réalisées, dans lesquelles des échantillons de culture en masse au plateau de croissance, maintenus dans les conditions habituelles (25°C, obscurité, barbotage d'air et CO_2 humidifiés*) ont reçu des doses d séparées par des intervalles de repos de 3 heures. Les dénombrements de clones permettent le calcul des taux de survie S_a calculés par rapport au nombre de cellules ensemencées (taux de survie absolu) et des taux de survie S_r calculés par rapport aux cellules capables de se multiplier après la dose d précédente (taux de survie relatif).

Dans le tableau III.13 (voir aussi l'exemple donné dans la figure III.13) sont présentés les taux de survie relatifs Sr pour diverses doses d et pour diverses cultures. Pour chaque culture et chaque dose d, deux séries sont effectuées en parallèle, de façon à mettre en évidence la dispersion des résultats. Pour la première dose d, c'est S_a qui est porté dans le tableau.

Sauf dans un cas sur 16, la première restauration n'est pas totale (Sr de la deuxième dose est inférieur à Sa de la première dose). La différence entre Sr et Sa est d'autant plus nette que la dose est plus grande. En effet, toutes les doses employées entraînent des taux de survie qui se placent dans l'épaulement de la courbe, et il est normal que les différences les plus significatives se produisent pour les doses d les plus élevées, doses pour lesquelles le nombre de lésions sublétales est le plus important.

Au-delà de la 2e dose d, on doit considérer que le taux de survie relatif est constant : il n'y a pas d'effet de la dose totale sur la capacité de restauration ; on peut considérer que des phénomènes identiques se déroulent à chaque irradiation et à chaque restauration, l'influence sur Sr des lésions non réparables devenant faible par rapport aux erreurs expérimentales sur Sr.

e) Influences de l'anoxie et d'une température de 0°C sur les processus de restauration

La présence d'oxygène ne semble pas nécessaire au fonctionnement des processus de restauration chez les cellules de Mammifères. Cependant, pour les plantes, HALL et CAVANAGH (1969) sur des racines de Vesces, et surtout HOWARD (1968) sur l'algue Oedogonium, limitent l'étendue de la restauration par l'anoxie. Ils s'opposent aux

---

* Le mélange est saturé en vapeur d'eau à 25°C pour éviter une modification de la densité cellulaire des échantillons (un contrôle de cette densité avec l'aide du compteur électronique de particules a été effectué sur chaque échantillon en fin d'expérience).

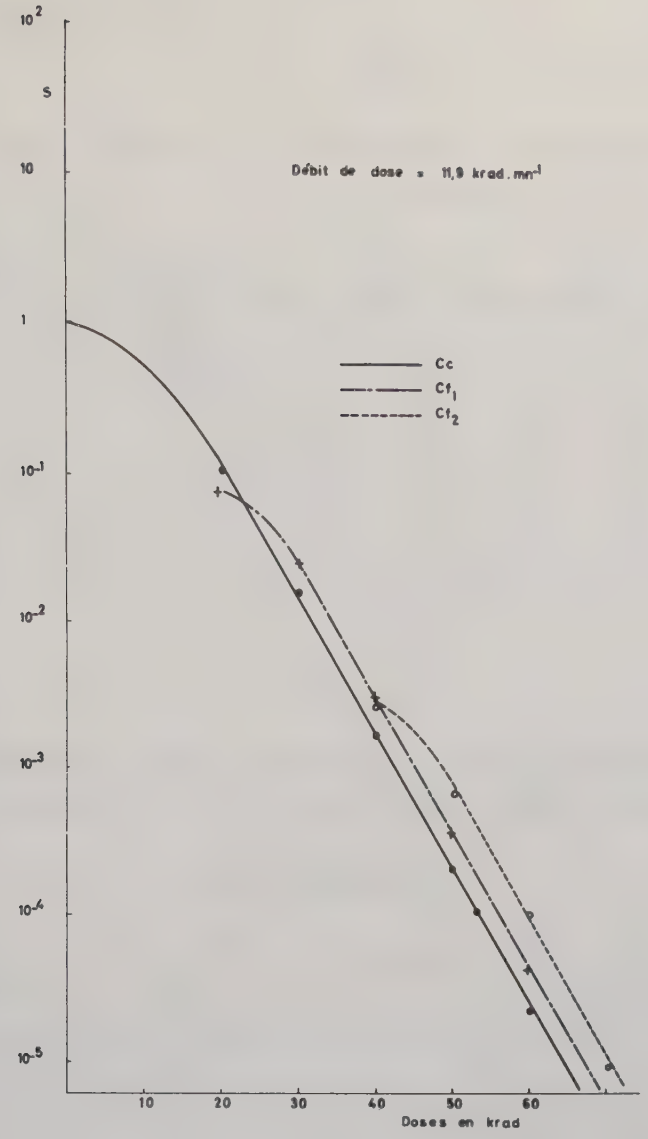


Fig. III.12 – Effet du double fractionnement des doses.
Cette figure permet de comparer trois courbes obtenues au même moment sur la même population de Chlorelles :
- une courbe Cc ;
- une courbe Cf_1 où les échantillons ont été soumis à D_1, T, d_i ;
- une courbe Cf_2 où les échantillons ont été soumis à D_1, T, D_1, T, d_i.

conclusions de VAN'T HOF (1970) qui travaille sur des méristèmes de racines de pois. Nous avons repris cette question chez les Chlorelles.

Sur des échantillons de la même culture, nous avons obtenu les courbes de survie suivantes :

- courbe de survie Cc_1 en milieu normalement aéré,
- courbe de survie Cc_2 où l'irradiation a été précédée d'abord d'un barbotage pendant 3 heures d'azote très pur (moins de 10 ppm en volume d'oxygène) puis d'un barbotage pendant 1 mn du mélange (air-CO_2),
- courbe de survie Cf_1 avec une dose D_1 de 20 krad. Mais, dès la fin de la dose D_1, l'oxygène est chassé par un courant d'azote maintenu durant trois heures, la dose d_i

TABLEAU III.13

Débit de dose : 10 krad.mn^{-1} ; d exprimé en krad

d	1ère dose d		2ème dose d		3ème dose d		4ème dose d		5ème dose d		6ème dose d	
en krad	1ère série = Sa	2ème série = Sa	1ère série Sr	2ème série Sr	1ère série Sr	2ème série Sr	1ère série Sr	2ème série Sr	1ère série Sr	2ème série Sr	1ère série Sr	2ème série Sr
7,5	0,577	0,554	0,447	0,467	0,464	0,464	0,471	0,466	0,426	0,423	0,45	0,417
7,5	0,301	0,325	0,329	0,295	0,320	0,334	0,281	0,290	0,281	0,269	0,288	0,320
8,7	0,493	0,495	0,423	0,401	0,394	0,442						
8,7	0,456	0,446	0,337	0,398	0,379	0,346	0,367	0,392	0,301	0,295		
10	0,385	0,392	0,32	0,32	0,288	0,267	0,321	0,323	0,254	0,231		
10	0,35	0,35	0,295	0,249	0,199	0,329	0,200	0,161	0,537	0,217		
20	0,132	0,130	0,0779	0,0709	0,064	0,101	0,085	0,086	0,073	0,0633		
20	0,0828	0,0865	0,0460	0,0420	0,05	0,061	0,043	0,0545	0,095	0,0675		

étant précédée d'une réoxygénation par barbotage pendant 1 mn du mélange (air-CO_2)

Les résultats sont exprimés dans la figure III.14 et le tableau III.14.

TABLEAU III.14

Désignation des courbes		n	Do	Dq	Conditions d'irradiation
1ère expérience (culture de 7 jours)	Cc_1	5,5	5	8,8	Irradiation en milieu oxygéné
	Cc_2	5,5	5	8,8	Barbotage d'azote 3h ; air et CO_2 1 mn ; irradiation
	Cf_1	3	5,2	4,8	D_1 en milieu oxygéné, azote 3 h, air et CO_2 1 mn, d_i
2e expérience (culture de 15 jours)	Cc	7	4,9	9,2	Irradiation en milieu oxygéné
	Cf	1,8	5,3	2,8	D_1 en milieu oxygéné, azote 3 h, air et CO_2 1 mn, d_i.

Ce tableau montre que, pendant un repos sous anoxie :

1) il existe une restauration

2) cette restauration présente les mêmes caractéristiques que dans le cas où le repos a lieu en milieu aéré.

On peut objecter à cette expérience que le repos ne s'est pas entièrement déroulé sous anoxie.

C'est pourquoi nous avons effectué une étude de la restauration sous azote,

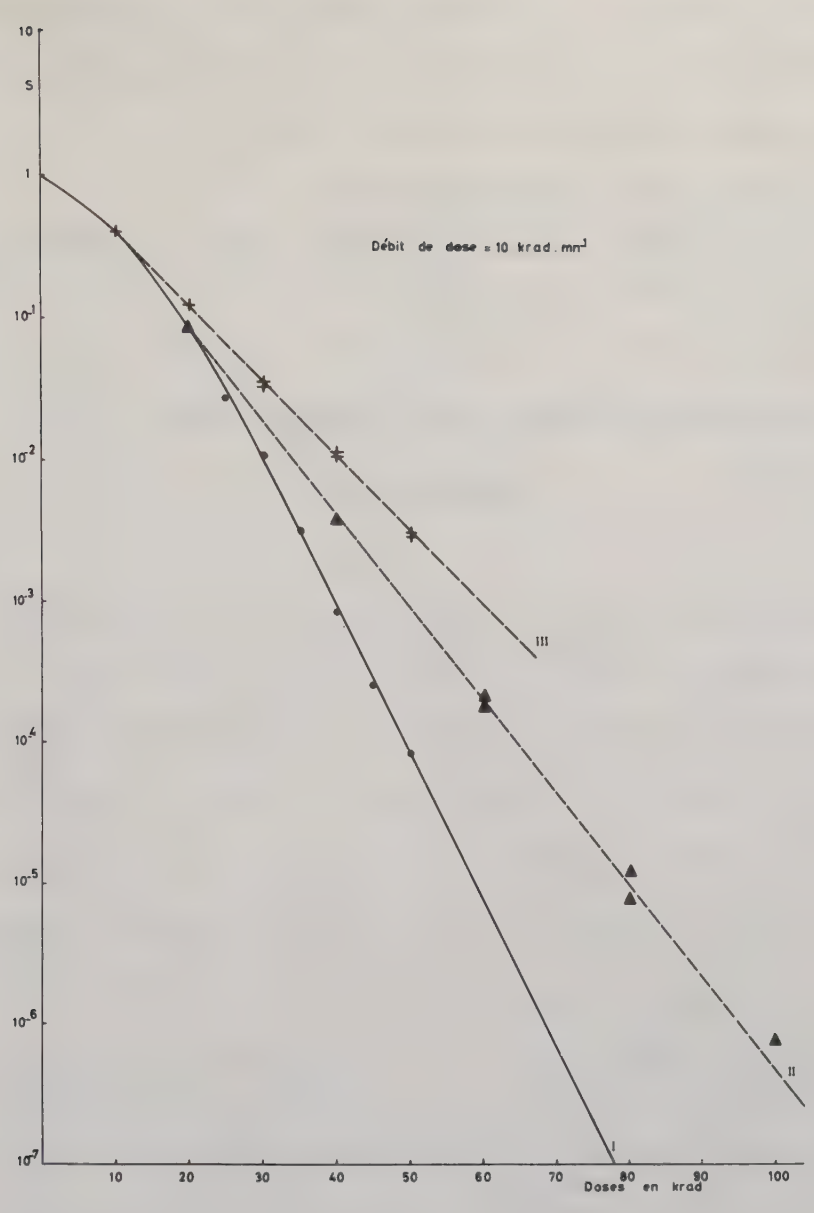


Fig. III.13 – Fractionnement multiple avec diverses doses d :
- I : courbe Cc ;
- II : courbe Cm pour d = 20 krad ;
- III : courbe Cm pour d = 10 krad.

On a porté pour chaque courbe les valeurs trouvées dans les deux séries d'échantillons (pour certaines doses, les deux valeurs sont identiques et un seul point les représente).

par des expériences d'irradiation conduites sous anoxie : les échantillons sont débarrassés de leur oxygène par l'azote et sont maintenus sous barbotage d'azote depuis le début de la dose D_1 jusqu'à la fin de la dose d_i. La figure III.15 prouve qu'une restauration a lieu dans ces conditions.

Ces résultats rejoignent ceux de DALRYMPLE et coll. (1969), BERRY (1966) et s'apparentent à ceux de BRYANT (1969). Il reste à expliquer les différences entre les résultats obtenus ici chez les Chlorelles et ceux de HOWARD. On peut supposer que les Chlorelles ont un métabolisme plus actif qu'Oedogonium en vie anaérobie et qu'elles peuvent dégrader leurs réserves (amidon surtout) sans oxygène.

Une température de 0°C arrêtant pratiquement la progression dans le cycle des Chlorelles synchronisées, il était tentant d'étudier les effets de cette température sur la restauration. Dans ce but, nous avons comparé les courbes obtenues avec des échantillons prélevés dans une même culture dans les diverses conditions suivantes :

A : échantillons à 25°C ; irradiation à 25°C.

B ; échantillons à 0°C ; réchauffement rapide à 25°C ; irradiation à 25°C.

C : échantillons à 0°C ; irradiation à 0°C.

D : échantillons à 0°C ; D_1 = 20 krad à 0°C ; T à 0°C ; d_i à 0°C.

Les résultats sont donnés dans le tableau ci-après.

TABLEAU III.15

N° des courbes		Sc ou Sf pour diverses doses totales en krad					Conditions d'expérience en ce qui concerne la température
		20	30	40	50	60	
1ère expérience (culture de 9 jours)	A Cc	$9,18.10^{-2}$	$1,58.10^{-2}$		$1,8.10^{-4}$	$2,4.10^{-5}$	25°C
	B Cc	$9,48.10^{-2}$	$1,41.10^{-2}$	2.10^{-3}	$1,3.10^{-4}$	$1,4.10^{-5}$	0°C ; 25°C ; irradiat.
	C Cc	$8,82.10^{-2}$	$1,54.10^{-2}$			$1,8.10^{-5}$	0°C
	D Cf	$8,3.10^{-2}$	$1,4.10^{-2}$	$2,1.10^{-3}$		$2,4.10^{-5}$	0°C
2ème expérience (culture de 7 jours)	A Cc	$3,83.10^{-2}$	$2,4.10^{-3}$	$7,5.10^{-5}$	$5,3.10^{-6}$		25°C
	C Cc	$3,5.10^{-2}$	$2,2.10^{-3}$	$7,2.10^{-5}$			0°C
	D Cf	$2,5.10^{-2}$	$1,8.10^{-3}$	$6,4.10^{-5}$	$3,4.10^{-6}$		0°C
3ème expérience (culture de 14 jours)	A Cc	$1,22.10^{-1}$	$2,08.10^{-2}$	$3,4.10^{-3}$	4.10^{-4}		25°C
	C Cc	$9,8.10^{-2}$	$1,7.10^{-2}$	$2,5.10^{-3}$	$2,9.10^{-4}$		0°C
	D Cf	$1,06.10^{-1}$	$2,6.10^{-2}$	$4,8.10^{-3}$	$1,3.10^{-3}$		0°C
4ème expérience (culture de 8 jours)	Cc_1	$6,5.10^{-2}$	$7,6.10^{-3}$	$7,3.10^{-4}$	$5,5.10^{-5}$		25°C
	Cc_2	$7,7.10^{-2}$	$1,2.10^{-2}$	$1,2.10^{-3}$	$9,2.10^{-5}$		0°C
	Cf_1	$7,7.10^{-2}$	$1,6.10^{-2}$	$2,5.10^{-3}$	$2,5.10^{-4}$		25°C
	Cf_2	$7,4.10^{-2}$	$1,1.10^{-2}$	$1,9.10^{-3}$	$1,5.10^{-4}$		0°C

Ces résultats n'ont pas toute la netteté désirable en raison des difficultés de maintenir une température de 0°C avec précision : la nacelle qui contient le récipient d'irradiation est remplie de glace, mais elle est plongée dans de l'eau à 18°C ; le mélange gazeux de barbotage n'arrive pas à 0°C dans les échantillons. Cependant, ils permettent d'affirmer qu'une température de 0°C ne modifie pas d'une manière très sensible les courbes de survie obtenues en irradiations aiguës, mais cette température de 0°C limite l'étendue

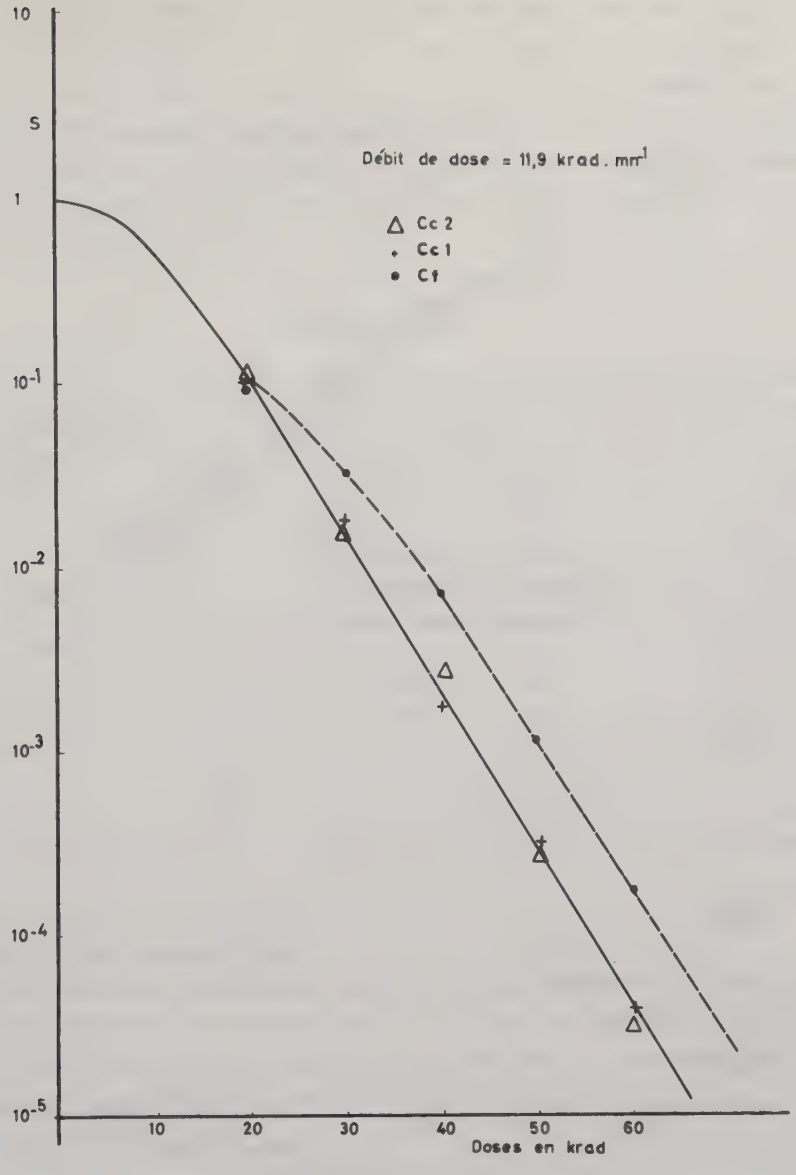


Fig. III.14 – Restauration sous anoxie :
- Cc_1 : sans fractionnement de dose, conditions habituelles ;
- Cc_2 : " " " " , échantillons maintenus 3 heures sous anoxie et réoxygénés pendant 1 mn avant l'irradiation ;
- Cf : avec fractionnement de dose ; temps de repos T sous anoxie.

de la restauration obtenue pour un temps de repos de 3 heures.

Il resterait à savoir si cette limitation après 3 heures correspond à un ralentissement de la cinétique de la restauration ou à une augmentation de la fréquence de lésions sublétales non restaurables. Des expériences de cinétique de la restauration à 0°C permettraient d'étudier ce sujet.

f) Les processus de restauration en fonction du cycle cellulaire

Chez les cellules de Mammifères, la valeur de la survie varie en fonction du temps de repos. Elle s'élève, passe par un maximum, puis décroît pour augmenter de nouveau. On explique ces variations par le fait que les cellules évoluent durant le temps

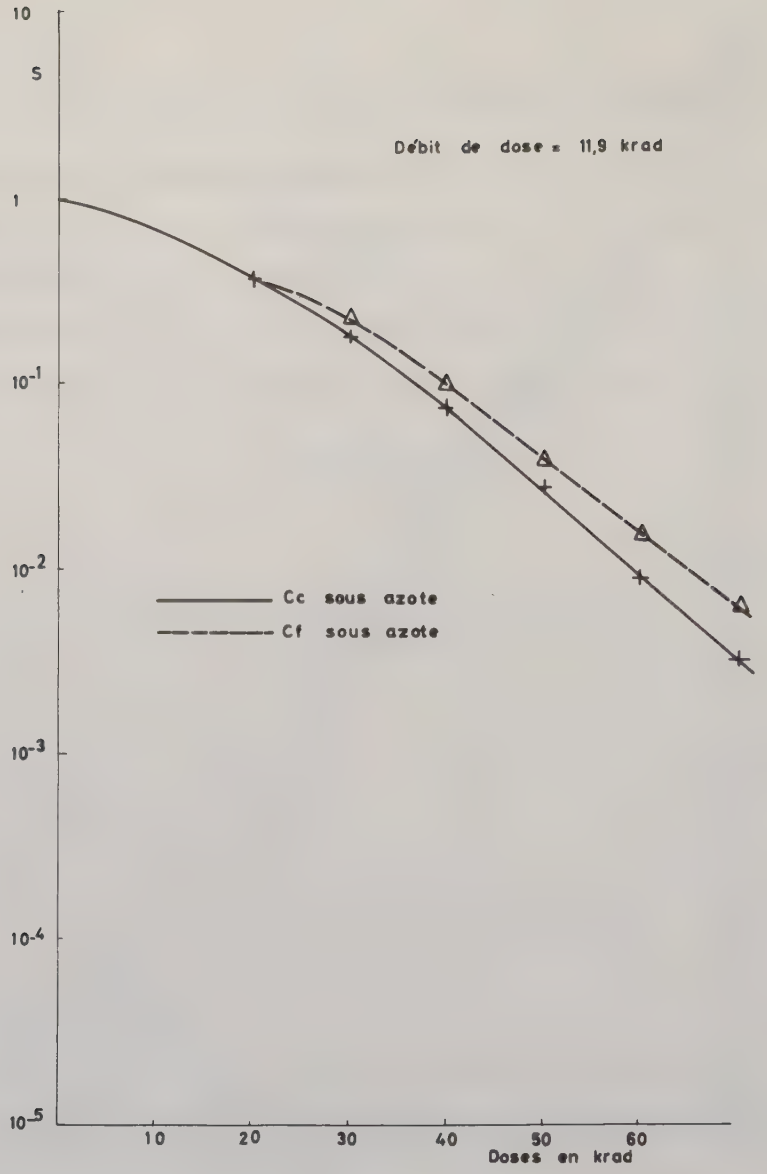


Fig. III.15 – Irradiation et restauration sous anoxie.

de repos et que la 1ère irradiation amène une certaine synchronisation du cycle pour les cellules irradiées. Selon la durée du temps de repos, on donnerait les doses d_i à des populations cellulaires ayant gagné un stade ou un autre, plus ou moins radiosensible, du cycle cellulaire. On peut se demander également si le pouvoir de restauration ne dépend pas du stade cellulaire irradié. Si c'était le cas, les différences de radiosensibilité d'un stade à un autre seraient dues aux variations de la valeur de la restauration en fonction du stade cellulaire.

On a tenté de répondre à ces questions à l'aide de Chlorelles synchronisées par alternance de lumière et d'obscurité : on peut, pendant la phase d'éclairement, interrompre ou perturber le déroulement du cycle par la mise à l'obscurité.

Dès la mise à l'obscurité pendant la phase de lumière, on arrête l'évolution de la taille des cellules, comme le montre la figure III.16 : A représente le diagramme en valeurs cumulées des classes de taille des Chlorelles lors du prélèvement des échantillons ;

B le diagramme pour les échantillons irradiés dans les récipients d'irradiation à 20 krad et conservés 3 h en culture à l'obscurité ; C le diagramme pour les échantillons irradiés à 20 krad et conservés en culture 3 h à la lumière. Le diagramme C est confondu avec celui qui est obtenu au même moment sur la culture où ont été prélevés les échantillons.

Cependant, la mise à l'obscurité au cours de la phase de lumière ne correspond pas à un arrêt du métabolisme cellulaire. DALMON (communication personnelle) a montré que la mise à l'obscurité à la 10ème heure de lumière provoquait l'induction de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique du noyau.

TABLEAU III.16

Désignation des expériences et position du prélèvement dans le cycle		Cf avec lumière durant T = 3 h			Cf à l'obscurité durant T = 3 h		
		n	Do	Dq	n	Do	Dq
A	0 h L	2	4,1	2,4	2,1	4,8	3,2
	4 h L	3	3,3	4	2	4,2	2,8
	8 h L	2	3,6	3,2	2	3,9	2,8
B	0 h L	5	3,2	5,6	5	3,2	5,6
	8 h L	2,2	3,2	2,8	3	3,5	3,6
C	4 h L	2	3,4	2,4	1,7	3,9	2,0
	12 h L	6	3,4	6	2	3,5	2

Le résultat précédent est confirmé par l'expérience résumée dans le tableau III.17 et conduite de la manière suivante :

Trois séries d'échantillons sont prélevées au début du cycle d'une culture synchronisée, et irradiées avec D_1 = 20 krad. Les temps de repos à la lumière durent 3 heures pour la première série, 6 heures pour la seconde et 9 heures pour la troisième ; après chaque temps de repos, les échantillons reçoivent les doses d_i.

TABLEAU III.17

Valeurs de Sc ou Sf selon la dose totale

Référence	Durée de culture après D_1=20	Dose totale 20 krad	Dose totale 30 krad	Dose totale 35 krad	Dose totale 40 krad
Cc	0	$4,13.10^{-2}$	$2,2.10^{-3}$	$3,4.10^{-4}$	$5,4.10^{-5}$
Cf_1	3 h	$3,15.10^{-2}$	$5,4.10^{-3}$	$1,9.10^{-3}$	$2,3.10^{-4}$
Cf_2	6 h	$3,12.10^{-2}$	$5,9.10^{-3}$	$1,4.10^{-3}$	4.10^{-4}
Cf_3	9 h	$3,17.10^{-2}$	$5,4.10^{-3}$	$1,3.10^{-3}$	2.10^{-4}

C - IRRADIATIONS SUBAIGUES

Elles ont été définies à partir des résultats expérimentaux : ce sont, ici, des irradiations effectuées à 25°C avec des débits de dose compris entre 0,06 et 2,5

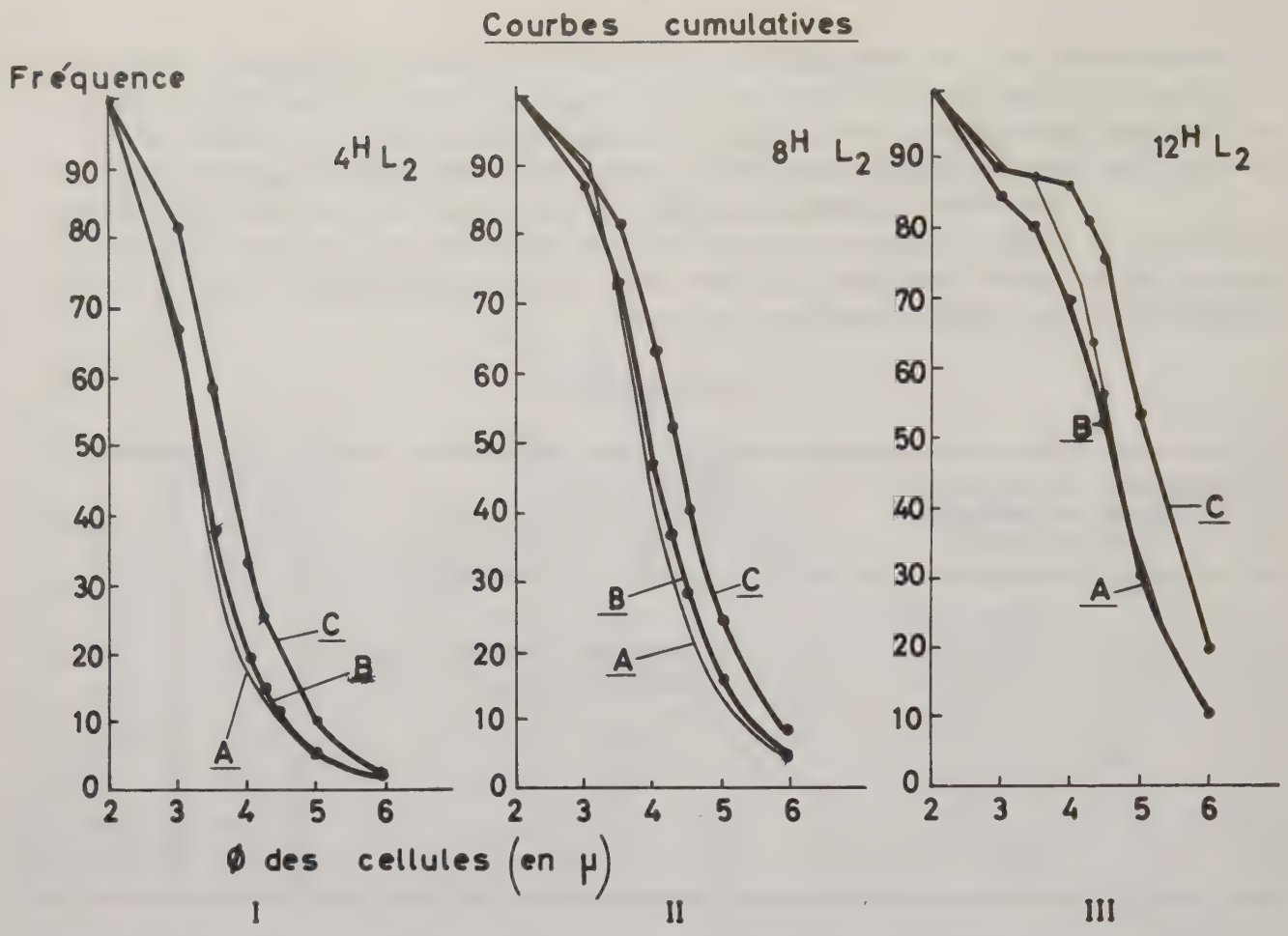


Fig. III.16 – Evolution du diagramme des tailles de différentes populations de Chlorelles synchronisées placées dans diverses conditions de repos (courbes cumulatives).

- I : population prélevée après 4 heures de lumière dans un cycle,
- II : " " " 8 " " " "
- III : " " " 12 " " " "

Pour chaque ensemble de diagrammes, A désigne la courbe obtenue au moment du prélèvement, B celle obtenue après irradiation et 3 heures de repos à l'obscurité, C celle obtenue après irradiation et 3 heures de repos à la lumière.

krad.mn^{-1}. Dans cette gamme de débits, pour des échantillons prélevés à un moment donné dans une culture donnée, les courbes de survie voient leurs caractéristiques dépendre du débit de dose utilisé (tableau III.18).

Pour des cultures en masse considérées à leur plateau de croissance, les phénomènes sont comparables à ceux trouvés pour les irradiations aiguës mais la radiosensibilité apparente est moins importante (tableau III.18).

La figure III.17 donne une idée de la précision des résultats expérimentaux.

Avec des expériences portant sur des cultures synchronisées, on retrouve la même évolution au cours du cycle que lors des irradiations aiguës. Mais la radiosensibilité apparente est plus faible dans le cas des irradiations subaiguës (figure III.18).

Qualitativement, les résultats apparaissent comme très semblables, que l'irradiation soit aiguë ou qu'elle soit subaiguë. Dans ce dernier cas, les irradiations sont plus longues et la radiosensibilité apparente inférieure. Puisque les irradiations ont lieu en milieu aéré par un barbotage du mélange air-CO_2, on ne peut pas suspecter l'effet de l'anoxie. On doit donc penser que la restauration peut avoir lieu sous irradiation et qu'elle

TABLEAU III.18

Désignation de la culture	Débit de dose	n	Do	Dq	Age en jours de la culture	Densité en 10^6 cellules.ml^{-1}	Taux de clonage
A	0,85	6	4,2	8,1	7	300	0,79
B	0,85	10	3,9	8,8	8	250	1
C	0,85	2,7	6,1	6	8	216	0,87
D	0,85	2,5	3,9	6,4	8	210	0,94
E	0,85	2,8	5,4	6	10	300	0,8
F	0,85	3	6,1	6,4	10	220	0,8
G	0,85	4	4,85	8	9	300	0,93
	0,85	3	5,6	6,8	13	300	0,63
H	0,4	1,8	6,8	4	13	190	0,72
I	0,06	1,3	9	2	8	182	0,93
J	0,06	1,3	9	2	10	228	0,85
K	0,06	1,3	9	2	15	206	0,77

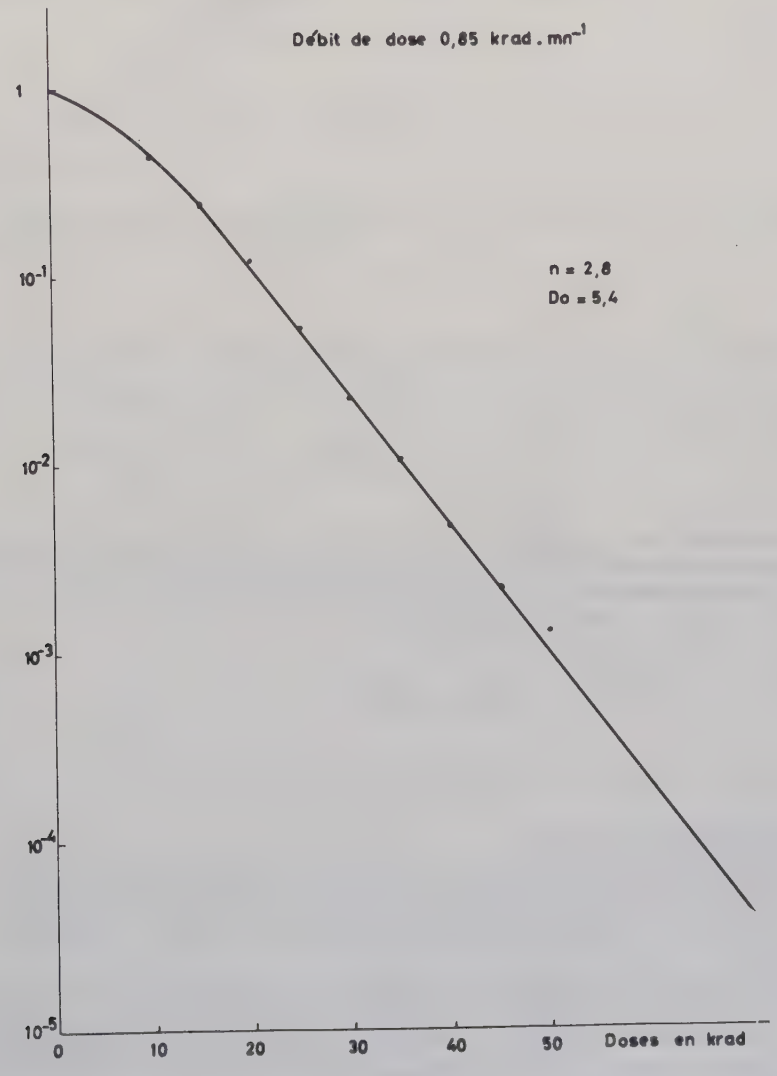


Fig. III.17 – Illustration de la précision des courbes obtenues en irradiation subaiguë.

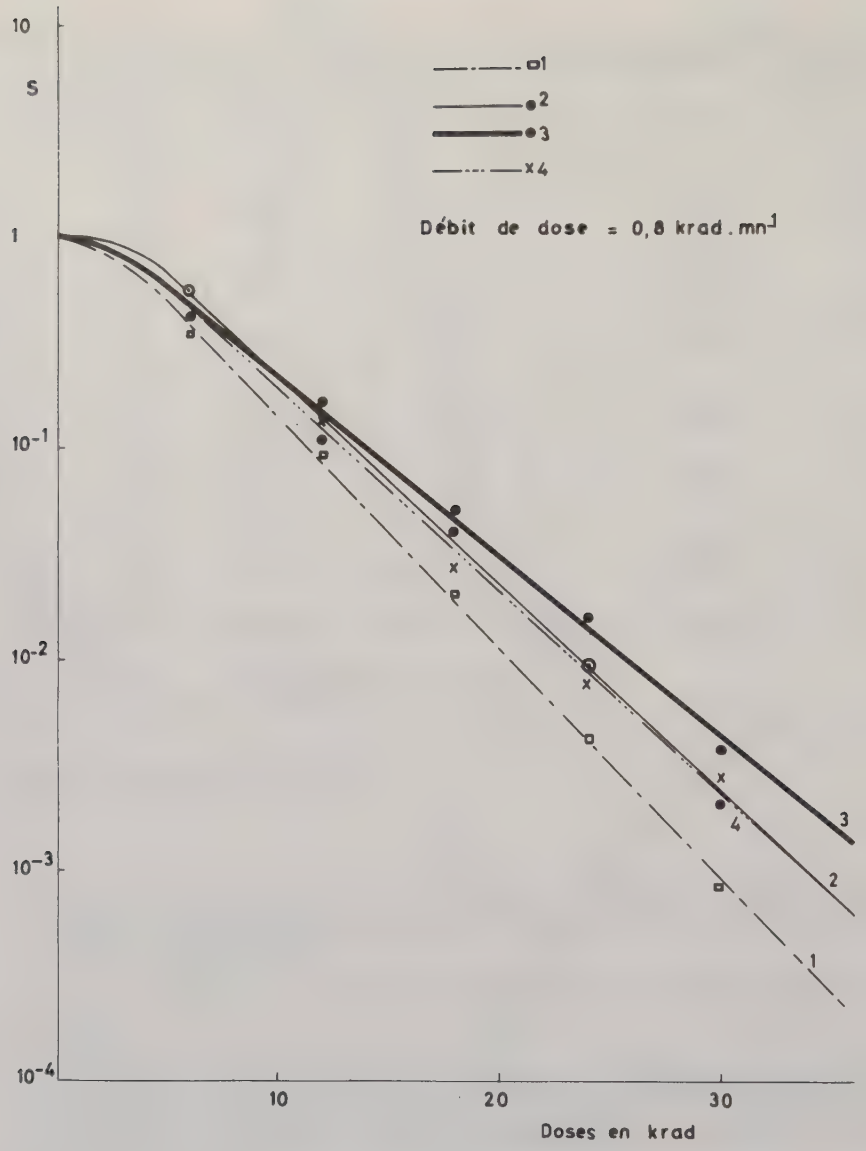


Fig. III.18 - Evolution de la radiosensibilité au cours d'un cycle d'une population synchronisée de Chlorelles (irradiation subaiguë).
Courbes obtenues avec des échantillons prélevés :
1) après 9 heures de lumière ;
2) " 12 " " ;
3) " 15 " " ;
4) " 2 " d'obscurité.

diminue la radiosensibilité apparente.

D'ailleurs, quand la durée d'irradiation de D_1 atteint 50 mn, il n'est pas toujours possible de mettre en évidence une restauration durant un temps de repos de 3 heures (fig. III.19).

Afin d'avoir confirmation de l'effet de la restauration sur la radiosensibilité apparente en irradiations subaiguës, nous avons répété trois fois l'expérience suivante : nous avons irradié 3 séries d'échantillons provenant - au même moment - d'une même culture ; une première série à 0,8 krad.mn^{-1} et 25°C, une deuxième série à 0,8

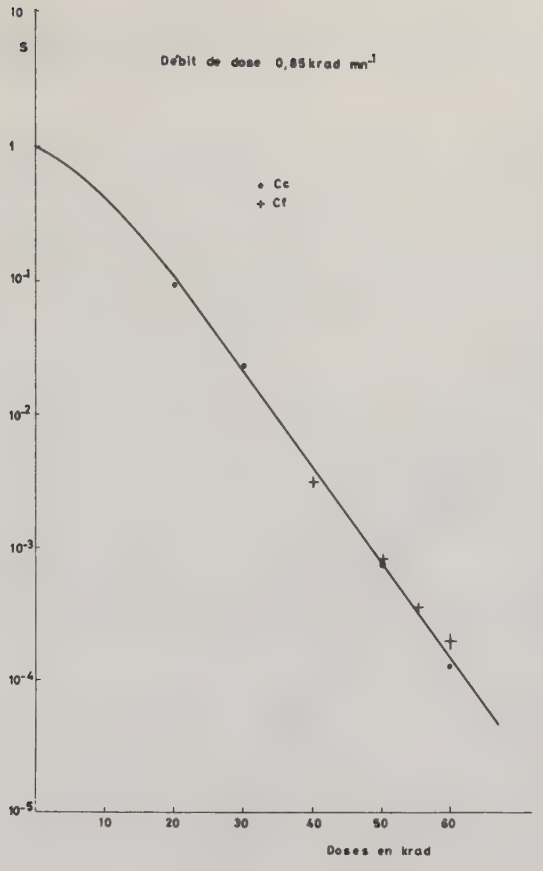


Fig. III.19 – Exemple de résultats obtenus dans l'étude de la restauration quand D_1 a été donné en 50 mn.

krad.mn^{-1} et une température la plus voisine possible de 0°C, et une troisième série à 11 krad.mn^{-1} et 25°C. Les résultats sont donnés dans le tableau III.19 et la figure III.20.

TABLEAU III.19

Désignation des expériences	0,8 krad.mn^{-1} ; 25°C			0,8 krad.mn^{-1} ; 0°C			11 krad.mn^{-1} ; 25°C		
	n	Do	Dq	n	Do	Dq	n	Do	Dq
A	2,6	6,1	5,6	2,3	3,9	12			
B	14	5,9	16	3,8	5,8	8	6,5	5,3	9,2
C	2,5	5,8	4,8	3	4,9	12	14	4	10

Dans ces expériences, en raison des difficultés techniques déjà signalées (cf. paragraphe III.e), la température de 0°C n'a pas été maintenue avec la rigueur nécessaire au niveau des algues. C'est la cause du manque de netteté des résultats. Cependant, les résultats permettent d'affirmer que si on limite les processus de restauration, ou si on les ralentit, on tend – pour des débits de dose très faibles – à retrouver les courbes de survies obtenues pour des débits de dose élevés.

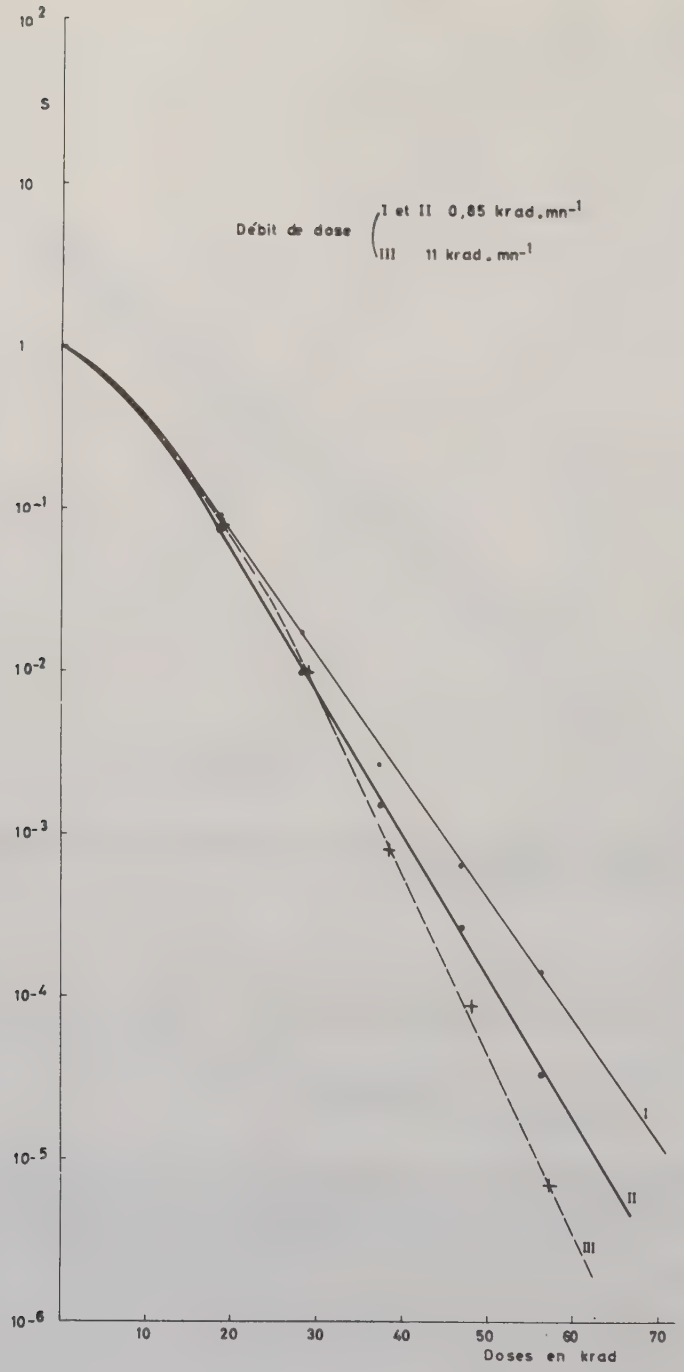


Fig. III.20 - Mise en évidence de l'intervention des phénomènes de restauration dans l'influence du débit de dose sur la radiosensibilité apparente. Courbes effectuées au même moment sur la même culture :

- I : à 0,8 krad.mn^{-1} et 25°C. La restauration intervient au cours de l'irradiation ;
- II : à 0,8 krad.mn^{-1} et 0°C. La restauration est limitée ;
- III : à 11 krad.mn^{-1} et 25°C.

Pour mieux connaître l'effet de l'irradiation sur les processus de restauration, nous avons comparé en même temps, sur des échantillons prélevés dans la même culture :

- l'effet d'une succession d'irradiations aiguës de doses d, chacune d'elles étant séparée de la précédente par un temps de repos de 3 heures ;
- l'effet d'irradiations subaiguës telles que la dose totale, en fin d'expérience, soit la même dans les deux cas.

En raison des montages d'irradiation dont nous disposons, nous avons seulement expérimenté dans les conditions suivantes :

Dose d = 8,7 krad, donnée à un débit de 10 krad.mn^{-1}, et irradiation subaiguë avec un débit de dose de 0,061 krad.mn^{-1} (3,65 krad.h^{-1}). Les expériences ont duré 12 heures avec cinq irradiations de 8,7 krad pour l'irradiation fractionnée.

Les résultats présentés dans la figure III.21 ont été retrouvés quatre fois, ils montrent que les deux courbes ne sont pas distinctes.

La restauration s'exerce de la même façon sous irradiation comme en dehors de l'irradiation.

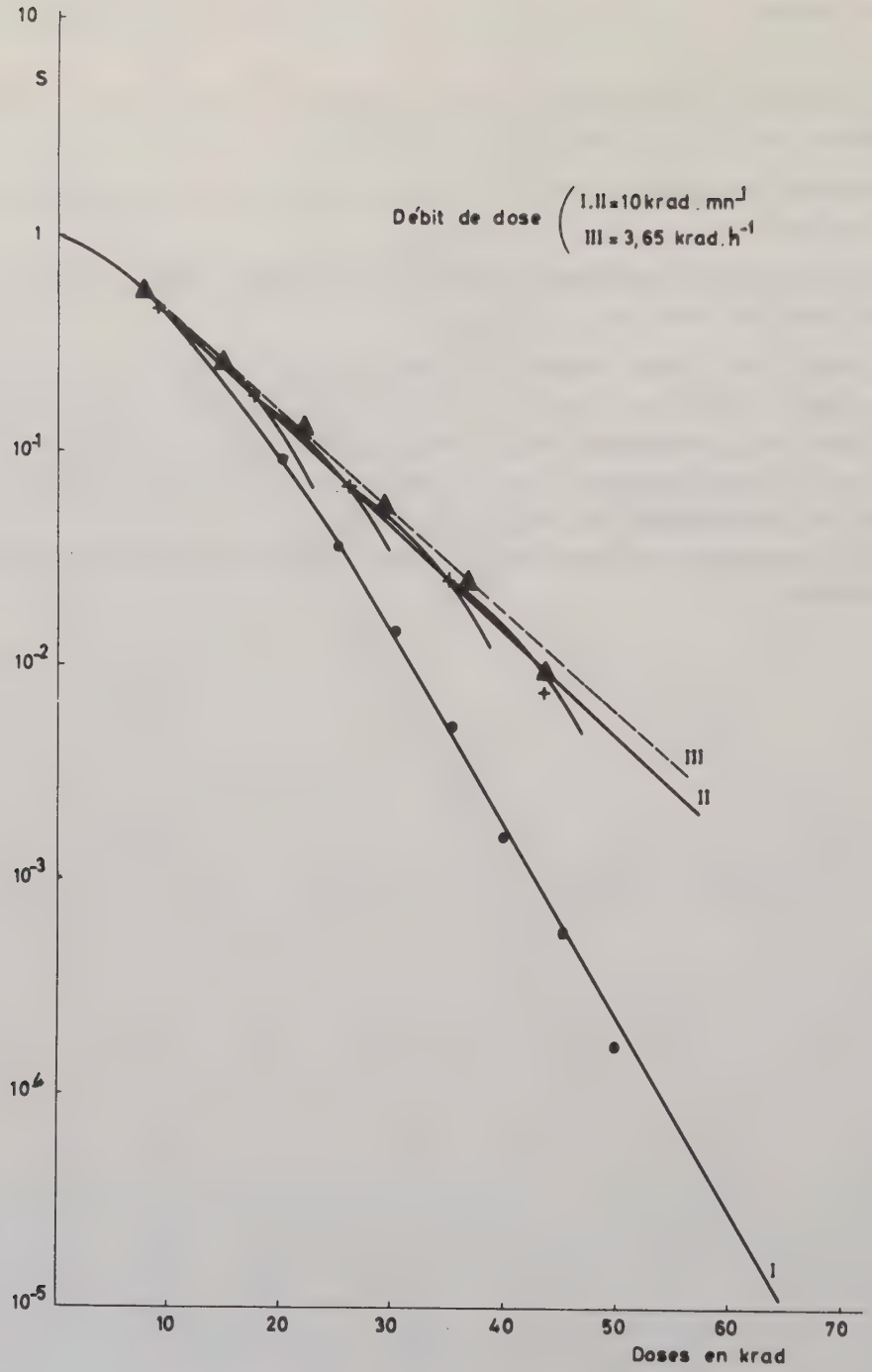


Fig. III.21 – Comparaison des courbes obtenues en irradiation subaiguë d'une part, et en irradiation aiguë, fractionnée ou non, d'autre part.

- I : courbe Cc obtenue sans fractionnement de dose à 10 krad.mn^{-1}
- II : " Cm " en irradiation aiguë fractionnée (débit de dose 10 krad.mn^{-1} ; 5 doses de 8,7 krad, chacune étant séparée de la précédente par un repos de 3 heures ;
- III : courbe obtenue sans fractionnement de dose, à un débit de 0,06 krad.mn^{-1}.

CHAPITRE IV

RECHERCHE D'UN MODELE POUVANT RENDRE COMPTE DES RESULTATS EXPERIMENTAUX OBTENUS

GENERALITES

D'après les connaissances actuelles en génétique, physiologie cellulaire, radiochimie, radiophysique, on serait amené à penser que les processus qui conduisent, après irradiation, à l'arrêt de la multiplication cellulaire sont variés et d'une très grande complexité que l'on est loin de pouvoir analyser. De plus, ces processus ne semblent pas aussi brutaux que leur traduction dans une courbe de survie le laisserait croire, puisqu'il existe des colonies provenant de cellules irradiées, dont le développement cesse après un nombre variable de divisions cellulaires. Cependant, les courbes de survie sont des courbes sigmoïdes, même lorsqu'on peut déterminer des taux de survie dans une gamme allant de 1 à 10^{-7}.

La simplicité apparente des courbes peut s'interpréter comme traduisant le fait que quelques processus seulement ou certaines combinaisons de processus sont, en fait, responsables de l'arrêt de la multiplication cellulaire après irradiation. De toute façon, elle justifie le choix d'hypothèses simples pour rendre compte des effets de l'irradiation.

On reste loin d'une interprétation certaine des courbes de survie. Les divers modèles proposés sont cependant intéressants dans la mesure où ils suggèrent des plans d'expérience ; par exemple, la théorie de la cible a attiré l'attention des chercheurs sur les cassures des chromosomes.

On peut interpréter l'effet de l'irradiation comme étant une modification d'une part de la quantité d'information contenue dans une cellule, d'autre part dans le processus de transmission à une cellule-fille. On se rapproche ainsi d'ATLAN (1968) qui a développé les idées de YOCKEY (1958). Ce dernier auteur s'intéressait aux facteurs générateurs d'erreurs dans la transmission de l'information. L'acide désoxyribonucléique est la source, le message écrit est la séquence de base associée aux lettres de type i ; la sortie est l'acide ribonucléique correspondant ; le message accepté est la séquence de bases associées aux lettres de type j. Le canal qui peut être l'objet d'un bruit est le couplage entre les lettres i et j.

Un essai a été tenté ici en s'intéressant à la perturbation de la source elle-même. Il n'a pas abouti, peut-être seulement par manque de contact avec un spécialiste de la théorie de l'information. En raison de l'évolution des résultats expérimentaux et des idées qui en découlent, c'est une voie dont il serait nécessaire de reprendre l'étude.

RAPPEL DES RESULTATS QUALITATIFS OBTENUS

Qualitativement, les résultats expérimentaux peuvent se résumer ainsi :

- Les courbes de survie présentent un épaulement. Cet épaulement est particulièrement important pour les courbes obtenues à partir de Chlorelles qui ont été prélevées dans les cultures au plateau de croissance, en ce qui concerne la densité cellulaire. L'épaulement traduit l'existence de lésions qui n'entraînent pas l'arrêt de la multiplication cellulaire, mais dont l'accumulation peut amener cet arrêt ;
- la restauration consiste dans l'élimination de lésions sublétales, en dehors de toute réplication de l'acide désoxyribonucléique nécessaire à la multiplication cellulaire ;
- cette restauration existe et croît avec le temps de repos selon une fonction qui semble d'allure exponentielle. Elle atteint, à 25°C, un maximum en 3 heures et reste pratiquement constante durant 24 heures ;
- la restauration maximum ainsi atteinte n'est pas totale : une courbe obtenue avec fractionnement des doses et temps de repos entre les deux fractions (une dose D_1, un temps de repos, une dose d_i complémentaire) est une courbe sigmoïde comme la courbe tracée sans fractionnement des doses ; la partie exponentielle a la même pente pour les deux courbes, mais l'épaulement est moins important dans le cas de la courbe obtenue avec fractionnement des doses ;
- il n'y a pas de différence significative entre des courbes obtenues par irradiation continue à un débit de dose de 0,06 krad.mn^{-1}, ou obtenues par des irradiations fractionnées avec des fractions de 8,7 krad séparées par des temps de repos de 3 heures et données avec un débit de dose de 10 krad.mn^{-1}. A la fin de l'expérience, la dose totale reçue est la même dans les deux cas ;
- les processus de restauration interviennent dans l'influence du débit de dose sur la radiosensibilité apparente des Chlorelles. On n'a pas prouvé qu'ils sont seuls responsables, bien que les expériences comparatives de fractionnement multiple et d'irradiations à faible débit aillent dans ce sens ;
- l'arrêt de la multiplication cellulaire n'est pas un phénomène du "tout ou rien" puisque certaines cellules subissent une ou plusieurs divisions avant de cesser de se multiplier. Au-delà de quelques divisions, la survie est illimitée, mais certains clones présentent une perte cellulaire et on peut supposer que cette perte cellulaire permet l'élimination de lésions dues à l'irradiation. Cette élimination serait liée à la réplication de l'acide désoxyribonucléique et à la mitose. Une restauration clonale se produirait en plus de la restauration cellulaire. Dans nos expériences de fractionnement de doses, cette élimination des lésions n'a pas pu se manifester entre le début de la première irradiation et l'ensemencement.

APPLICATIONS DE LA THEORIE DE LA CIBLE

Les courbes de survie présentées dans le chapitre III ont été caractérisées par les paramètres n et Do définis par la figure III.1. On a bien insisté sur le fait que ces paramètres étaient utilisés pour rendre compte de la seule partie exponentielle des courbes.

On inclut ces paramètres dans la formule : $S = 1 - (1 - e^{-\frac{D}{Do}})^n$ expliquée

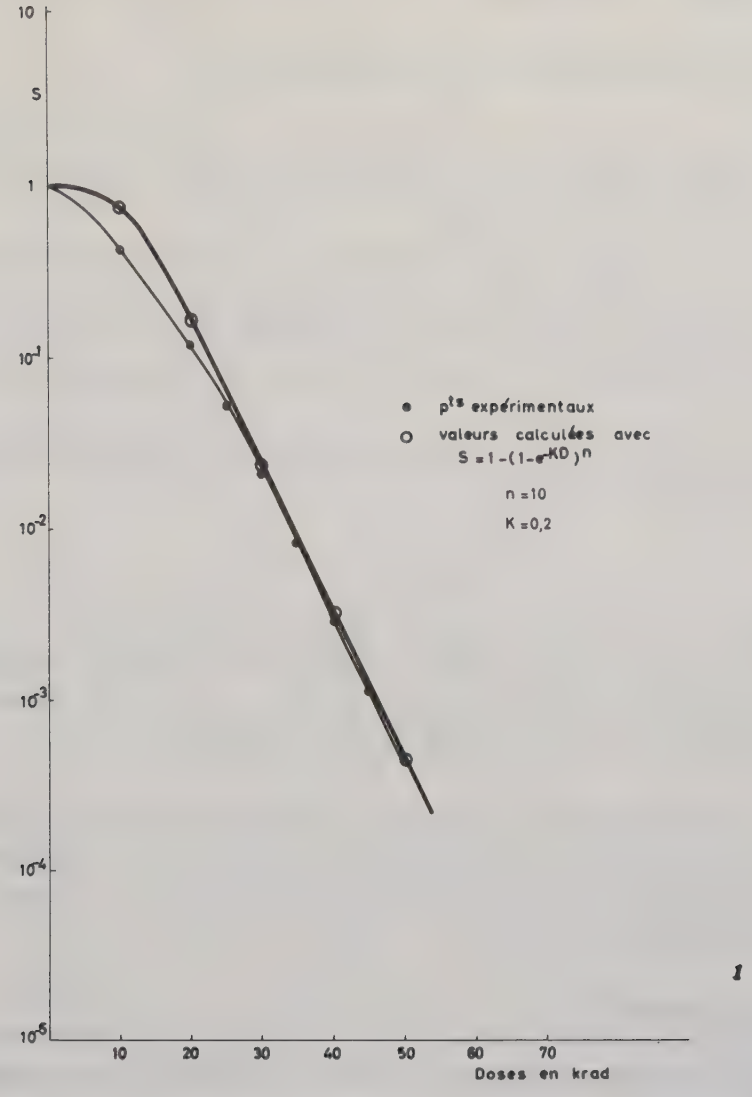


Figure IV.1 – Essais d'ajustement sur une courbe expérimentale.
Les paramètres sont calculés sur la partie exponentielle de la courbe expérimentale. Les calculs sont effectués avec la formule :

$$S = 1 - (1 - e^{-KD})^n .$$

généralement par la théorie de la cible mais qui peut découler d'hypothèses (MILLER, 1970) autres que celle de la théorie de la cible. Or, cette formule ne s'applique pas à nos courbes expérimentales. Les paramètres n et Do, tirés de la partie exponentielle d'une courbe expérimentale, donnent, sur le modèle $S = 1 - (1 - e^{-\frac{D}{Do}})^n$ une courbe calculée dont l'épaulement est plus arrondi que celui de la courbe expérimentale et se situe au-dessus de lui (Fig. IV.1).

On a essayé de tourner la difficulté en utilisant la formule $S = e^{-\mu D} [1 - (1 - e^{-\frac{D}{Do^*}})^n]$. Du fait de l'introduction d'un paramètre supplémentaire, on obtient un ajustement meilleur sur les données expérimentales. Mais la pente de la partie exponentielle est alors égale à $-(\mu + \frac{1}{Do^*})$ et il faudrait des données supplémentaires pour

déterminer les valeurs relatives de μ et de Do*.

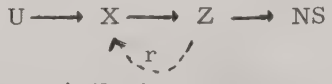
De plus il faudrait modifier l'un et l'autre schéma pour pouvoir tenir compte des processus de restauration.

RECHERCHE D'UNE INTERPRETATION DES RESULTATS

On peut chercher à décrire l'état de la population irradiée par des fonctions représentant la fréquence des lésions de chaque type dans la population considérée. On rejoint alors la théorie de l'information.

Pour simplifier, nous supposerons l'existence d'étapes dans les processus qui conduisent à la perte du pouvoir de multiplication, ce qu'a déjà fait DIENES (1966). La restauration correspond alors au fait que la cellule revient à un état antérieur. Comme la restauration maximum n'est pas totale, on considère deux hypothèses :

A - Après restauration, aucune des cellules lésées ne revient à son état initial. Le schéma le plus simple serait :



avec U = état initial ; NS = état où il n'y aura pas survie clonale ; X et Z = états intermédiaires entre U et NS. Pour les courbes obtenues en irradiation aiguë, et pour les courbes Cf obtenues avec fractionnement des doses, ce schéma se rapprochera de ceux qui découlent de l'hypothèse B et sera traité après le schéma B.

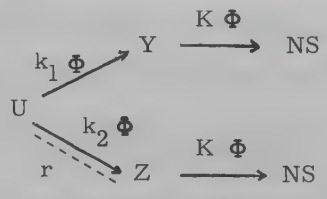
B - On considère deux catégories de cellules parmi les cellules survivantes qui portent des lésions sublétales : celles qui conservent les lésions sublétales au moins tant qu'il n'y a pas multiplication cellulaire (cellules dans l'état Y) et celles qui reviennent à l'état initial (cellules dans l'état Z).

ETUDE DE L'HYPOTHESE B

En irradiation aiguë, à la fin de l'épaulement, les cellules survivantes sont toutes dans l'état Y ou Z ; il n'y a plus de cellules dans l'état U. Comme l'étendue de la restauration est alors la même quels que soient la dose D_1 et le taux de survie, c'est qu'il n'y a pas de passage de l'état Y à l'état Z. On repousse donc le schéma de DEWEY et coll. (1970).

Puisque les courbes deviennent des exponentielles pures, il faut supposer que le passage des états Y et Z vers l'état létal se fait suivant une même loi exponentielle.

Si l'on considère que le passage de toute étape vers la suivante s'opère suivant une loi linéaire fonction du temps t et du débit de dose Φ, le schéma est le suivant :



Quand la restauration est négligeable au cours de l'irradiation, on peut remplacer les quantités Φt par D, puisque le temps n'intervient alors que pour fixer la

dose. Dans les calculs, on désignera par U, Y et Z les fréquences des cellules dans les états U, Y et Z.

Si, à un instant donné de l'irradiation, les stades U, Y, Z contiennent respectivement une fréquence de cellules U_o, Y_o, Z_o, quand l'irradiation se poursuit,

$$U = U_o\, e^{-(k_1 + k_2)\, D}$$

$$Y = Y_o\, e^{-kD} - \frac{k_1\, U_o}{K-k_1+k_2)} \left[e^{-kD} - e^{-(k_1 + k_2)D} \right]$$

$$Z = Z_o\, e^{-kD} - \frac{k_2\, U_o}{K-(k_1 + k_2)} \left[e^{-kD} - e^{-(k_1 + k_2)D} \right]$$

$$S = U + Y + Z$$

Avant la première irradiation, $U_o = 1$, $Y_o = Z_o = 0$.

Si l'on pose $k_1 + k_2 = \lambda_1$ et $K = \lambda_2$

$$U = e^{-\lambda_1 D}$$

$$Y = \frac{k_1}{\lambda_2 - \lambda_1}\, e^{-\lambda_1 D} - \frac{k_1}{\lambda_2 - \lambda_1}\, e^{-\lambda_2 D}$$

$$Z = \frac{k_2}{\lambda_2 - \lambda_1}\, e^{-\lambda_1 D} - \frac{k_2}{\lambda_2 - \lambda_1}\, e^{-\lambda_2 D}$$

$$S = e^{-\lambda_1 D} \left[1 + \frac{k_1}{\lambda_2 - \lambda_1} + \frac{k_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \right] - e^{-\lambda_2 D}\, \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1}$$

$$S = \frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1}\, e^{-\lambda_1 D} - \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1}\, e^{-\lambda_2 D}$$

L'expression de la survie est une somme algébrique de fonctions exponentielles. Or, il est bien connu (LANCZOS, 1956) que divers groupes de valeurs des paramètres peuvent rendre compte d'une même courbe expérimentale. Quel que soit le mode de calcul, on n'est jamais certain de connaître les vraies valeurs des paramètres. La manière la plus sûre est de rechercher des moyens expérimentaux qui permettent de définir les valeurs de certains paramètres ou des rapports entre paramètres. Par exemple, l'étude de la restauration maximum permettra de définir le rapport $\frac{k_1}{k_2}$. Si la restauration était totale, on aurait :

$$k_1 = 0$$

On a alors tenté d'appliquer le schéma sur les courbes.

Pour des commodités de calculs, on pose :

$$\frac{\lambda_1 + \lambda_2}{2} = \lambda \quad \text{et} \quad \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{2} = \mu$$

Quand μ est différent de 0, S peut s'écrire :

$$S = e^{-\lambda D} \left[\mathrm{Ch}\, \mu D + \frac{\lambda}{\mu}\, \mathrm{Sh}\, \mu D \right]$$

Quand $\mu = 0$ ($\lambda_2 = \lambda_1$, donc $K = k_1 + k_2$) S est de la forme :

$$S = e^{-\lambda D}(1 + \lambda D).$$

A partir de ces formules, on trace les courbes théoriques pour diverses valeurs de λ et de μ. Or, sur 47 courbes expérimentales traitées, une seule, d'ailleurs assez mal définie expérimentalement, correspond à une des courbes théoriques.

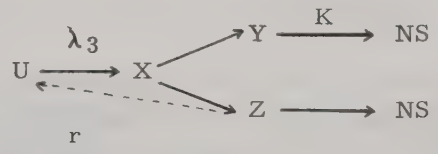
Sous cette forme, l'hypothèse B ne convient pas.

ETUDE DE L'HYPOTHESE A

Dans le cas de l'hypothèse A, en irradiation aiguë, après une première dose de rayonnement entraînant un taux de survie placé dans la partie exponentielle, on se trouve – après restauration – en présence de cellules dans les états NS et X. Pour les courbes obtenues avec fractionnement des doses, le calcul est le même que pour les courbes obtenues sans fractionnement des doses dans le cas de l'hypothèse B. Et, de même, l'application aux courbes expérimentales n'est pas satisfaisante.

ESSAI DE MODIFICATION DE L'HYPOTHESE B

Nous avons supposé l'existence d'une étape supplémentaire entre l'état initial U et les états Y et Z. Le schéma devient :



Si l'on pose $k_1 + k_2 = \lambda_2$, en irradiation aiguë où la restauration ne joue pas,

$$U = Uo\ e^{-\lambda_3 D}$$

$$X = \frac{\lambda_3 U_o}{\lambda_3 - \lambda_2}\left(e^{-\lambda_2 D} - e^{-\lambda_3 D}\right)$$

$$Y = \left\{ Yo + \frac{k_1 \lambda_3 U_o}{(\lambda_3 - K)(\lambda_2 - K)} \right\} e^{-KD} - \frac{k_1 \lambda_3 Uo}{(\lambda_3 - \lambda_2)(\lambda_2 - K)} e^{-\lambda_2 O} +$$

$$\frac{k_1 \lambda_3 Uo}{(\lambda_3 - \lambda_2)(\lambda_3 - K)} e^{-\lambda_3 D}$$

$$Z = Zo + \frac{k_2 \lambda_3 Uo}{(\lambda_3 - K)(\lambda_2 - K)} e^{-KD} - \frac{k_2 \lambda_3 Uo}{(\lambda_3 - \lambda_2)(\lambda_2 - K)} e^{-\lambda_2 D} +$$

$$\frac{k_2 \lambda_3 Uo}{(\lambda_3 - \lambda_2)(\lambda_3 - K)} e^{-\lambda_3 D}$$

L'expression de S comprendra 3 paramètres, K, $(k_1 + k_2)$, λ_3 ; plus le nombre de paramètres augmente, plus il est aisé d'ajuster une courbe théorique sur une courbe expérimentale. Comme deux paramètres suffisent à décrire la partie exponentielle

de la courbe, nous nous sommes demandé si 2 paramètres pouvaient conduire à des ajustements précis des courbes expérimentales. C'est pourquoi nous avons supposé que la probabilité de passage de U à X était la même que celle de X à Y ou Z.

Donc, $\lambda_3 = k_1 + k_2 = \lambda$;

on obtient alors :

$$U = Uo\, e^{-\lambda D}$$

$$X = Uo\, \lambda D\, e^{-\lambda D}$$

$$Y = \left(Yo + \frac{k_1 \lambda\ Uo}{(\lambda - K)^2}\right) e^{-KD} - \frac{k_1 \lambda\ Uo}{\lambda - K}\left(\frac{1}{\lambda - K} + D\right) e^{-\lambda D}$$

$$Z = \left(Zo + \frac{k_2 \lambda U_o}{(\lambda - K)^2}\right) e^{-KD} - \frac{k_2 \lambda\ Uo}{\lambda - D}\left(\frac{1}{\lambda - K} + D\right) e^{-\lambda D}$$

Avec Uo = 1 et Xo, Yo, Zo = 0

$$S = \frac{\lambda^2}{(\lambda - K)^2}\ e^{-KD} + \left(1 - \frac{K\lambda D}{\lambda - K} - \frac{\lambda^2}{(\lambda - K)^2}\right) e^{-\lambda D}$$

Dans l'exposé des résultats expérimentaux, nous avons utilisé, comme la plupart des auteurs, les paramètres n et Do, caractérisant le nombre d'extrapolation et la pente de la partie exponentielle des courbes de survie.

Posons ici $k = \frac{1}{Do}$ et $n_o^2 = n$

L'expression de la courbe de survie peut se faire à partir de ces deux paramètres :

$$S = n_o^2\, e^{-KD} + (1 - n_o^2\, e^{-KD} + (1 - n_o^2 - Kn_oD)\, e^{-\frac{n_o}{n_o - 1} KD}$$

avec $n_o^2 = \frac{\lambda^2}{(\lambda - K)^2}$

Application numérique aux courbes de survie obtenues sans fractionnement des doses

Ce schéma s'applique bien aux courbes expérimentales. Le tableau ci-dessous donne un exemple.

Courbe où Do = 4,17 et n = 13

K = 0,24 et λ = 0,332.

L'ajustement est satisfaisant et rend mieux compte de l'épaulement de la courbe que la formule $S = 1 - (1 - e^{-KD})^{n_o^2}$. Sur 12 courbes actuellement traitées, les résultats sont aussi satisfaisants.

Doses en krad	Valeurs de S expérimentales	S calculé selon l'hypothèse proposée	S calculé selon le schéma $S = 1 - (1 - e^{-KD})\, n_o^2$
10	0,3849	0,43	0,71
20	$0,828.10^{-1}$	$0,69.10^{-1}$	0,101
25	$0,277.10^{-1}$	$0,239.10^{-1}$	$0,317.10^{-1}$
30	$0,107.10^{-1}$	$0,792.10^{-2}$	$0,96.10^{-2}$
35	$0,323.10^{-2}$	$0,254.10^{-2}$	$0,29.10^{-2}$
40	$0,850.10^{-3}$	$0,801.10^{-3}$	$0,87.10^{-3}$
45	$0,260.10^{-3}$	$0,249.10^{-3}$	$0,26.10^{-3}$
50	$0,840.10^{-4}$	$0,765.10^{-4}$	$0,79.10^{-4}$

Application théorique aux courbes obtenues par fractionnement multiple :

Ce sont les courbes Cm tracées en joignant les points obtenus en portant en abscisse les doses d_1, $d_2 = 2\, d_1$, $d_3 = 3\, d_1$, etc ... Il s'agit d'une courbe arbitraire, car cette courbe ne traduit pas l'existence de phénomènes continus. Par contre, son allure donne des renseignements sur les caractéristiques des restaurations successives.

Dans les expériences réalisées ici, il n'y a pas eu de divisions entre la première irradiation et le moment de l'ensemencement ; les temps de restauration étaient suffisants pour que la restauration soit maximum.

A partir de la deuxième dose, chaque dose d s'exerce sur une population composée de cellules NS et de cellules dans les états Y ou U, les cellules dans l'état Z étant revenues à l'état initial U.

Après la deuxième dose d et la restauration, la population des cellules survivantes pourra être décrite en fonction des cellules survivantes après la première dose et la restauration, par la matrice :

$$\begin{vmatrix} U \\ Y \end{vmatrix}_2 = \begin{vmatrix} a & o \\ b & c \end{vmatrix} \begin{vmatrix} U \\ Y \end{vmatrix}_1$$

D'où, pour la $p^{ème}$ dose, $S_p = a^p + b\, \dfrac{a^p - c^p}{a - c}$

avec $a = x_2\, n_o^2\, e^{-Kd} + (1 + \lambda d - x_2 n_o^2\, \lambda\, n_o d)\, e^{-\lambda d}$

$b = x_1\, n_o^2\, e^{-Kd} - (x_1 n_o^2 + x_1 n_o^2 + x_1\, \lambda\, n_o d)\, e^{-\lambda d}$

$c = e^{-Kd}$

en posant $x_2 = \dfrac{k_2}{\lambda}$ et $x_1 = \dfrac{k_1}{\lambda}$, le terme en $e^{-\lambda d}$ devient vite petit devant le premier terme, dans l'expression de a et b, et c est petit devant a. On obtient alors :

$$S_p = a^p \left(1 + \frac{b}{a - c}\right) = a^p \left(\frac{a + b - c}{a - c}\right) \; ; \quad S_p = (x_2 n_o^2\, e^{-Kd})^p\, \frac{n_o^2 - 1}{x_2 n_o^2 - 1}$$

Application numérique aux résultats expérimentaux

La théorie proposée conduit à des courbes Cm qui sont des exponentielles,

ce qui est vérifié expérimentalement.

Pour effectuer un contrôle précis du modèle, il faudrait disposer des courbes Cc, Cf et Cm correspondantes, c'est-à-dire effectuées au même moment sur la même population de Chlorelles. Les courbes Cc et Cf permettraient de déterminer le rapport $\frac{k_1}{k_2}$ et de calculer les valeurs des paramètres de la courbe Cm théorique, que l'on pourrait comparer aux valeurs expérimentales.

En l'absence de telles expériences, nous avons relevé la valeur $k_1 = \frac{k_2}{2}$ sur des expériences antérieures où nous disposions des courbes Cc et Cf. Appliquée ici, cette valeur conduit, à partir de 4 courbes Cc à trouver des valeurs n_m de 1,4 à 1,6 pour les courbes Cm théoriques. Ces valeurs sont compatibles avec les valeurs expérimentales.

REMARQUES SUR LE MODELE PROPOSE

Ce modèle donne un schéma d'action des rayonnements au niveau de la cellule, à partir de résultats obtenus à l'échelle d'une population de Chlorelles irradiées. Logiquement, il faudrait en chercher confirmation par des études effectuées au niveau cellulaire.

Tout d'abord, il faudrait prouver l'existence de cellules dans les états Y et Z. D'après le schéma proposé, toutes les cellules survivantes sont dans l'état Y ou Z quand la dose de rayonnements donnée est telle que le taux de survie correspondant se situe dans la partie exponentielle de la courbe.

On peut penser que les cellules en Z à la fin de l'irradiation sont celles qui donnent des clones semblables à ceux issus de cellules non irradiées.

Les cellules dans l'état Y devraient donner une courbe de survie qui soit une exponentielle passant par 1 pour $D = 0$. Mais il est illusoire de les rechercher en irradiant une deuxième fois une suspension de Chlorelles déjà irradiée et remise en culture un certain temps. En effet, il est peu vraisemblable que ces cellules Y se multiplient plus rapidement que les cellules Z, et leur influence sur la courbe de survie sera de l'ordre des fluctuations obtenues d'une expérience à l'autre. Les cellules dans l'état Y pourraient être celles qui sont à l'origine de clones à secteurs clairs et ceci pose le problème d'une élimination des lésions sublétales non réparables, au cours des processus de multiplication cellulaire.

Dans l'état actuel du travail, le modèle n'est pas justifié ; simplement, il donne une image cohérente des résultats obtenus, et il permet, à partir de la connaissance de la courbe de survie obtenue en irradiation aiguë sans fractionnement des doses, de prévoir ce que sont les résultats dans le cas du fractionnement multiple.

Ce schéma a aussi le mérite d'attirer l'attention sur ce qui se passe aux doses faibles (taux de survie placés dans l'épaulement de la courbe), aux débits de dose faibles, au cours de la restauration (cinétique en une seule ou deux étapes).

Il est possible de spéculer sur ce que sont les étapes X, Y, Z, en reprenant les hypothèses de POHLIT (1970). Il n'est pas possible d'appliquer aux Chlorelles le schéma d'action des rayonnements que cet auteur a donné : les courbes obtenues en irradiation subaiguë ne présentent pas les deux exponentielles que cet auteur a trouvées chez les levures qu'il utilisait ; nous serions même tenté de suspecter un effet d'un état d'anoxie se développant au cours des irradiations chez ces levures. Néanmoins, avec POHLIT, il serait possible d'imaginer que, dans l'état initial, l'acide désoxyribonucléique est intact dans sa gaine de protéines et que le passage de l'état U à l'état X correspond à une

atteinte par l'irradiation de cette gaine de protéines.

On peut aussi remarquer que le schéma proposé ici peut être appliqué au cas des irradiations avec des particules à haut transfert linéique d'énergie. Dans ce cas, le passage de l'état U aux états Y et Z aurait une grande probabilité de survenir par rapport au passage de Y et Z vers NS. La courbe de survie dépendrait presque entièrement de cette étape. On aurait donc une exponentielle pure ; il ne serait pas possible de voir un effet de restauration. Par contre, il y aurait les mêmes types de clones que dans le cas des rayonnements ionisants, ce que BARENDSEN (1970) a récemment souligné.

CONCLUSION

Des données d'expériences effectuées sur les Chlorelles en ce qui concerne la multiplication cellulaire après irradiation X ou gamma, se dégagent plusieurs résultats importants.

Les Chlorelles présentent des courbes de survie clonale de même allure que les autres cellules eucaryotes et il est logique de chercher à généraliser les résultats obtenus sur ce matériel vivant particulier.

Puisque les Chlorelles sont des organismes unicellulaires de petite taille, qui ne se fixent pas fortement aux parois des récipients en raison de la présence d'une membrane complexe de nature pecto-cellulosique, on peut leur appliquer les techniques de la microbiologie, travailler avec des suspensions d'une densité de 200.10^6 cellules par millilitre, et obtenir, avec une bonne précision, des taux de survie de l'ordre de 10^{-6}. Il n'y a pas de sexualité chez les Chlorelles et l'on se trouve devant une juxtaposition de clones ; dans une colonie, il ne peut pas y avoir d'échanges du matériel héréditaire entre les cellules. La présence d'un appareil photosynthétique rend plus aisée l'obtention de divers types de cultures : on peut utiliser des milieux purement minéraux sur lesquels l'irradiation n'a pas d'effets de longue durée et obtenir une axénie parfaite sans ajouter d'antibiotiques qui perturbent la physiologie cellulaire, mais que l'on est souvent contraint d'employer dans la culture des cellules de mammifères.

L'autotrophie des Chlorelles rend possible la synchronisation des populations par une simple alternance de période de lumière et d'obscurité, méthode de mise en oeuvre plus aisée, vis-à-vis des cellules, que l'apport massif de certains précurseurs comme on le fait pour les cellules de mammifères. De plus, les Chlorelles s'adaptent à de nombreuses conditions de culture et prospèrent également en hétérotrophie.

D'une façon générale, on doit considérer que les Chlorelles sont cultivées dans des conditions plus naturelles que des cellules isolées d'un organisme pluricellulaire, et qu'elles sont - de ce fait - plus stables au cours des générations successives.

Par contre, certains des caractères des Chlorelles sont gênants dans ce type d'étude. Le plus embarassant est le fait que la multiplication cellulaire conduit à un nombre de cellules-filles qui est variable et dont le déterminisme nous échappe. De la variation de densité cellulaire, il n'est pas possible de déduire la fréquence des cellules qui se sont divisées ; on ne connaît pas le nombre de générations qui font passer d'une cellule initiale à une colonie de taille donnée. La petite taille des individus et la présence d'une membrane de nature pecto-cellulosique rendent difficile l'observation cytologique, mais celle-ci est peu utilisée dans ce travail.

Il faut ajouter que l'impossibilité d'opérer des analyses génétiques par

croisement entre des mutants limite les types d'études radiobiologiques possibles avec les Chlorelles. De plus, l'interprétation de certains résultats reste douteuse en raison d'un manque de connaissance concernant le cycle cellulaire chez les Chlorelles ; le cycle est mal connu parce qu'il est difficile d'observer les chromosomes et de déterminer si la synthèse des acides désoxyribonucléiques a lieu en une ou plusieurs fois pour un individu donné.

Si l'on se réfère aux diagrammes des tailles des cellules dont le volume varie d'un facteur 30 et plus au cours du cycle cellulaire, à la durée de la libération des autospores, aux images cytologiques obtenues au microscope électronique, la synchronisation que nous avons obtenue dans nos cultures synchronisées est satisfaisante. Or, la radiosensibilité au cours d'un cycle varie peu. On ne peut donc pas expliquer les différences de radiosensibilité constatées entre des populations issues de diverses cultures, par la fréquence des divers stades des cellules qui composent la population. On doit même souligner le fait que des populations contenant un nombre élevé de cellules où il y a eu synthèse d'ADN et même division cellulaire n'ont pas une radiosensibilité abaissée notablement, alors que les lésions causées à l'ADN semblent bien responsables de l'arrêt de la multiplication cellulaire après irradiation ; une cellule irradiée ne peut pas être réduite à son seul ADN.

Cette idée est renforcée par le fait que l'état physiologique des cultures joue un rôle puisque la radiosensibilité décroît et tend vers un palier lorsque les cultures vieillissent. Cette remarque a d'ailleurs un intérêt pratique en radiothérapie puisque les tumeurs contiennent des cellules à l'état de vie ralentie.

On devrait étudier maintenant en quoi l'état physiologique des Chlorelles varie au cours du vieillissement d'une culture, et tout d'abord étudier, en fonction du vieillissement cellulaire, l'étendue et la cinétique de la restauration des lésions sublétales créées par l'irradiation.

L'augmentation du taux de survie qui résulte du fractionnement des doses en 2 à 5 parties égales ou inégales a permis d'aborder l'étude de cette restauration. Les conditions expérimentales ont été choisies telles qu'il n'y ait pas de divisions cellulaires entre la première fraction de dose et l'ensemencement des cellules, et même, qu'il n'y ait pas réplication de l'acide désoxyribonucléique au cours de l'expérimentation.

Les Chlorelles, comme les autres cellules, présentent une restauration maximum dans les quelques heures qui suivent l'irradiation lorsqu'elles sont maintenues à la température de culture. A 0°C, la restauration est ralentie.

La diminution de la radiosensibilité apparente des Chlorelles avec la diminution du débit de dose s'explique par l'existence des phénomènes de restauration qui se produisent même sous irradiation. Pour que les Chlorelles reçoivent une même dose, plus le débit est faible, plus la durée de l'irradiation est longue, et plus l'intervention des processus de restauration est importante durant l'irradiation. A faible débit de dose, quand la première fraction de dose a été donnée en plus d'une heure, le fractionnement des doses en deux n'augmente pas nettement le taux de survie.

On peut définir un débit de dose au-dessus duquel l'irradiation est aiguë, c'est-à-dire que les phénomènes de restauration qui ont lieu pendant l'irradiation sont au plus de l'ordre des erreurs expérimentales, et au-dessous duquel l'irradiation est subaiguë. La valeur de ce débit de dose dépend de la température d'irradiation.

A 0°C, les courbes de survie obtenues à un débit de dose élevé - qui donne à 25°C des irradiations aiguës - sont inchangées ; à 0°C, les courbes obtenues en irradiations qui, à 25°C, seraient subaiguës, se rapprochent alors de celles obtenues en irradiations aiguës, mais sans recouvrir ces dernières. On peut expliquer ce dernier fait par

deux hypothèses qui ne s'excluent pas : la température n'aurait pas été maintenue, au moins localement, à 0°C durant l'irradiation ; la température de 0°C ralentirait mais n'arrêterait pas les processus de restauration.

Les cinétiques de restauration obtenues ici en faisant varier le temps de repos qui s'écoule entre les fractions de doses données en irradiation aiguë, ne sont pas excellentes. Cependant, elles permettent d'affirmer qu'on ne retrouve pas les fluctuations de la restauration apparente bien connues chez les cellules de mammifères ; chez ces dernières, ces fluctuations sont expliquées par une synchronisation partielle des cellules sous l'effet de la première fraction de dose, ce qui place les cellules dans tel ou tel stade cellulaire lors de la deuxième fraction en fonction du temps de repos. Chez les Chlorelles où la radiosensibilité varie peu en fonction du stade cellulaire, il est normal de trouver une réponse plus monotone à la variation de la durée du repos entre les fractions de doses. De même, la restauration étudiée sur populations de Chlorelles synchronisées a les mêmes caractéristiques que celle étudiée sur cultures stables. Ce résultat est valable pour tous les stades cellulaires, que la poursuite du cycle cellulaire s'exerce normalement ou soit perturbée durant le temps de repos.

Les processus de restauration au niveau cellulaire apparaissent comme étant mieux définis chez les Chlorelles que chez les cellules de mammifères, dans des expériences de fractionnement de doses.

En irradiation aiguë, la pente de la partie exponentielle d'une courbe obtenue après fractionnement de doses et celle de la courbe correspondante obtenue sans fractionnement des doses, sont identiques. Dès qu'il y a saturation en dégâts sublétaux, les processus sont les mêmes, que la restauration ait pu jouer complètement ou non.

Les résultats énoncés ci-dessus sont compatibles avec l'idée d'une restauration s'exerçant par l'intermédiaire des processus enzymatiques normaux de la cellule vivante. De ce fait, l'étude des processus de restauration après irradiation ne concerne pas seulement la radiobiologie mais le fonctionnement normal de la cellule et la protection par la cellule de l'intégrité de l'information qu'elle contient.

Les processus de restauration nécessitent sans doute une dépense d'énergie pour la cellule mais même les conditions d'anoxie n'empêchent pas le catabolisme de se produire chez les Chlorelles. Ils sont très radiorésistants puisqu'ils se produisent même après une dose qui, donnée en une fois, conduirait à un taux de survie de l'ordre de 10^{-4}.

Ces processus de restauration ne peuvent pas être mis en évidence dans le cas d'irradiation alpha à l'aide du ^{210}Po, comme l'a montré ROUX (1970) sur la même souche de Chlorelles cultivée dans les mêmes conditions que pour ce travail. Ce fait est à rapprocher de la distribution spatiale de l'énergie déposée par les rayonnements : pour une même dose qu'aux rayons gamma, les particules alpha irradient un volume plus faible de la cellule mais libèrent une densité locale d'énergie plus élevée. Ceci renforce la notion dégagée plus haut, de l'importance de l'environnement des acides désoxyribonucléiques dans la radiosensibilité cellulaire.

Chez les Chlorelles, la restauration obtenue avec un fractionnement en deux doses n'apparaît jamais comme totale. Mais au cours de fractionnements successifs, la restauration se manifeste à chaque temps de repos. On ne peut donc pas concevoir un épuisement de la capacité de restauration et on doit supposer que l'irradiation crée, chez les Chlorelles, des lésions non réparables à côté de lésions réparables.

La question se pose de savoir s'il en de même pour les cellules de mammifères ou si les Chlorelles ont une réaction propre à l'irradiation. Mais en remarquant que

ce résultat n'a pu être obtenu que par la haute précision qu'il est possible d'atteindre pour les courbes de survie avec les Chlorelles, on peut croire que ce phénomène est général et c'est pourquoi nous avons tenté d'intégrer ces résultats dans un schéma de l'action des rayonnements sur la cellule.

A notre connaissance, le seul modèle qui intégrait l'existence des phénomènes de restauration était celui de HAYNES. Or, ce modèle ne s'applique pas aux résultats exposés ici puisqu'il suppose que la restauration maximum décroît avec la dose de rayonnement, ce qui se traduit par le fait que la pente de la partie exponentielle de la courbe obtenue après fractionnement est plus importante que celle obtenue sans fractionnement des doses.

Avant d'aborder toute réflexion sur un modèle qui traduit un phénomène de type exponentiel, il faut se souvenir que tout paramètre en exposant peut être décomposé en plusieurs paramètres, que tout groupe de paramètres peut être remplacé par un autre groupe de paramètres conduisant à une aussi bonne approximation des résultats expérimentaux, qu'on peut trouver des modèles très différents dans leur essence et leurs principes qui fournissent des bases de calculs très voisines. C'est pourquoi la discussion sur le choix entre des systèmes multicible à un coup ou multicoup à une cible, ou une combinaison des deux, apparaît souvent comme factice.

Nous avons pensé que proposer un modèle n'avait de sens qu'en restant le plus près possible des résultats qualitatifs d'expériences, en ne faisant intervenir les données quantitatives que le plus tard possible et en cherchant des types d'expériences pouvant conduire à la détermination la plus directe possible des paramètres utilisés. L'existence de l'épaulement de la courbe de survie, le fait que l'arrêt de la multiplication cellulaire quand il a lieu se place à divers moments du développement des clones, suggèrent que l'arrêt de la multiplication ne s'opère pas par une loi du "tout ou rien" mais à travers des étapes successives. Nous les avons schématisées par trois étapes.

Nous avons distingué deux catégories de lésions : les lésions non réparables et les lésions réparables. Pour arriver d'une façon simple à des courbes de survie théoriques d'allure exponentielle, nous avons supposé que les changements de fréquence des cellules d'une étape à l'étape suivante s'opérait suivant une loi linéaire fonction de la dose. Malgré l'incertitude de nos résultats expérimentaux concernant la cinétique fine des processus de restauration nous avons considéré que la restauration s'opérait suivant une loi exponentielle fonction du seul facteur "temps" à une température donnée.

L'intérêt radiobiologique du modèle est d'essayer de s'éloigner, au moins momentanément, de la théorie de la cible, dans l'interprétation des courbes de survie, de mettre en relief les phénomènes qui se déroulent aux faibles doses de rayonnement quand le taux de survie se place dans la partie épaulement de la courbe de survie, de suggérer la conduite des expériences de fractionnement multiple.

Le modèle pose aussi le problème du devenir des cellules qui se multiplient et qui possèdent des lésions sublétales non réparables. Si ces lésions se perpétuent au cours du développement du clone, on peut parler de mutations, et on devrait, par la culture de clones provenant d'un nombre suffisant de Chlorelles irradiées, sélectionner des souches dont les courbes de survie tendraient à être des exponentielles pures.

Mais il n'est pas certain qu'on puisse isoler ces clones : en effet, les cellules mortes qui apparaissent dans certains clones correspondraient à une élimination des lésions qui s'accumuleraient dans certaines des cellules-filles. Ce phénomène est connu chez les levures et chez les cellules de mammifères.

A côté de la restauration qui est une élimination des lésions au niveau cellulaire, existerait une élimination des lésions au niveau du clone. Il serait du plus haut intérêt d'appuyer ces idées sur une expérimentation, puisque, au cours des générations successives, une lignée cellulaire pourrait réajuster l'information qu'elle porte.

En conclusion, il n'est pas question de résoudre tous les problèmes de la radiobiologie par les seules courbes de survie, aussi loin que leur analyse soit poussée ; mais les courbes de survie qui traduisent l'expression de lésions créées par l'irradiation au niveau du pouvoir essentiel qu'est la multiplication cellulaire, gardent toute leur valeur pratique en radiothérapie et radiostérilisation et leur valeur fondamentale pour guider les recherches en radiobiologie, en biologie moléculaire et en physiologie cellulaire. Ce sont elles qui permettent de décider des doses intéressantes à étudier et des modalités de l'irradiation. Elles sont loin d'avoir fourni tous les enseignements que l'on peut en attendre.

PHOTOGRAPHIES ET FIGURES

Figure II.1 – Diagramme illustrant le cycle cellulaire de Chlorella ellipsoidea.

II.2 – Montage de photographies illustrant le cycle cellulaire de Chlorella pyrenoidosa.

II.3 – Métabolisme des ADN au cours du cycle cellulaire d'une population de Chlorelles synchronisée.

II.4 – Coupes de Chlorelles provenant de divers types de culture.

II.5 – Schéma du dispositif de culture en masse.

II.6 – Croissance d'une culture en masse.

II.7 – Evolution des diagrammes de tailles cellulaires pour une population de Chlorelles en culture de masse.

II.8 – Evolution des diagrammes de tailles des cellules d'une population synchrone au cours de 3 cycles successifs.

II.9a – Dispositif d'irradiation aux rayons γ.

II.9b – Dispositif d'irradiation aux rayons γ.

II.10 – Spectre des rayons X utilisés.

II.11 – Un des dispositifs d'irradiation aux rayons X.

Planche III.1 – Exemples de développement de clones provenant de Chlorelles non irradiées.

III.2 – Exemples d'évolution de Chlorelles irradiées non survivantes.

III.3 – Exemples d'évolution de Chlorelles irradiées survivantes.

Figure III.1 – Définition des paramètres utilisés.

III.2 – Illustration de la reproductibilité des courbes de survie.

III.3 – Influence du traitement des échantillons sur les résultats d'irradiation.

III.4 – Effet de l'anoxie.

III.5 – Influence du débit de dose sur les courbes de survie.

III.6 – Effet du débit de dose sur les courbes de survie.

III.7 – Influence de l'âge de la culture sur la radiosensibilité.

Figure III.8 – Variation de la radiosensibilité au cours d'un cycle d'une même culture synchronisée (irradiation aiguë).

III.9 – Définition des paramètres utilisés pour décrire les courbes obtenues dans les expériences de fractionnement de doses.

III.10 – Mise en évidence de la restauration en fonction du temps de repos T.

III.11 – Influence de la dose D_1 sur les courbes Cf.

III.12 – Effet du double fractionnement des doses.

III.13 – Fractionnement multiple avec diverses doses d.

III.14 – Restauration sous anoxie.

III.15 – Irradiation et restauration sous anoxie.

III.16 – Evolution du diagramme des tailles de différentes populations de Chlorelles synchronisées placées dans diverses conditions de repos (courbes cumulatives).

III.17 – Illustration de la précision des courbes obtenues en irradiation subaiguë.

III.18 – Evolution de la radiosensibilité au cours d'un cycle d'une population synchronisée de Chlorelles (irradiation subaiguë).

III.19 – Exemple de résultats obtenus dans l'étude de la restauration quand D_1 a été donné en 50 mn.

III.20 – Mise en évidence de l'intervention des phénomènes de restauration dans l'influence du débit de dose sur la radiosensibilité apparente.

III.21 – Comparaison des courbes obtenues en irradiation subaiguë d'une part, et en irradiation aiguë, fractionnée ou non, d'autre part.

IV.1 – Essai d'ajustement sur une courbe expérimentale.

BIBLIOGRAPHIE

ALPER, T., HOWARD, A., KIEFER, J., 1969.

Radiobiological terminology.
Nature, 224, 5219, 625-626.

ALPER, T., 1968.

Low oxygen enhancement ratios for radiosensitive bacterial strains, and the probable interaction of two types of primary lesion.
Nature, 217, 5131, 862-863.

ALTMANN, H., FETTER, F., PFISTERER, E., SZILVINYI, A.V., KAINDL, K., 1968.

Investigation on radiation effects on DNA synthesis in synchronous Chlorella cells.
Monatsch. Chem., 99, 1145-1152.

ARCHAMBEAU, J.O., DREW, R.M., ROBERTSON, J.S., 1964.

Dose-survival curves for HeLa cell cultures using thermal neutrons and the B^{10} (n, a) Li^{7} reaction.
RNL 7542 SM-44/35.

ATLAN, H., 1968.

Application of information theory to the study of the stimulating effects of ionizing radiation, thermal energy and other environmental factors.
J. Theor. Biol. 21, 45-70.

BACCHETTI, S., CASSANDRO, M., ELLI, R., FALCHETTI, R., MAURO, F., 1966.

Relationship between recovery from sublethal damage by dose fractionation and the restoration of viability after delayed plating in diploid Saccharomyces cerevisiae.
Radiat. Res. 29, 2, 295-315.

BACCHETTI, S., ELLI, R., FALCHETTI, R., MAURO, F., SACCHI, A., 1966.

Recovery from X-ray-induced sub-lethal damage in Saccharomyces cerevisiae cells of different ploidy.
Int. J. Radiat. Biol. 10, 3, 213-221.

BARENDSEN, G.W., 1964.

Impairment of the proliferative capacity of human cells in culture by α particles with different linear-energy-transfer.
Int. J. Radiat. Biol. 8, 5, 453-466.

BARENDSEN, G.W., 1966.

Relative effectiveness of ionizing radiations in relation to let and the influence of oxygen.
Dans Biophysical Aspects of Radiation Quality AIEA Technical Reports Series n° 58.

BARENDSEN, G.W., 1970.

The dependance of damage in mammalian cells on radiation quality. IVe Congrès international de Radiobiologie et de Physico-Chimie des rayonnements, EVIAN, 29 juin-4 juillet 1970 - France.

BARENDSEN, G.W., WALTER, H.M.D., 1964.

Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture IV Modification of radiation damage.
Radiat. Res., 21, 314-329.

BARSUKOV, V.S., MALINOVSKII, O.V., MITYUSHOVA, N.M., 1966.

Nature of postirradiation recovery of yeast cells from dominant lethal's under conditions of temperary delay of reproductive activity.
Genetika, 4, 136-146.

BATEMAN, J.L., 1968.

Relation of irradiation dose-rate effects in mammals and in mammalian cells.
BNL, 12581.

BEDFORD, J.S., HALL, E.J., 1966.

On the shape of the dose-response curve for HeLa cells cultured in vitro and exposed to Gamma-radiation.
Nature, 209, 5030, 1363-1364.

BENDER, M.A., GOOCH, P.C., 1962.

The kinetics of X-ray survival of mammalian cells in vitro.
Int. J. Radiat. Biol. 5, 2, 133-145.

BERRY, R.J., 1966.

Effects of some metabolic inhibitors on X-ray dose-response curves for the survival of mammalian cells in vitro, and on early recovery between fractionated X-ray doses.
Brit. J. Radiol. 39, 462, 458-463.

BERRY, R.J., 1967.

On the use of an arbitrary minimum clone size to define survival of cell reproductive capacity. An analysis of clone size distribution in HeLa cells X-irradiated after attachment to a polystyrene surface.
Radiat. Res. 30, 2, 237-247.

BERRY, R.J., HALL, E.J., CAVANAGH, J., 1970.

Radiosensitivity and the oxygen effect for mammalian cells cultured in vitro in stationary phase.
Brit. J. Radiol. 43, 506, 81-90.

BIERMAN, A., 1963.

A general target theory of radiobiological action.
Bull. Math. Biophys., 25, 273-296.

BONET-MAURY, P., 1969.

La radiostérilisation dans l'industrie pharmaceutique.
J. Biol. Med. Nucl. n° 78, pp. 7-16.

BONHAM, K., PALUMBO, R., 1951.

Effects of X-rays on snails, crustacea and algae.
Growth, 15, 155-188.

BRUCE, A.K., MALCHMAN, W.H., 1965.

Radiation sensitization of Micrococcus radiodurans, Sarcina lutea, and Escherichia coli by p-Hydroxymercuribenzoate.
Radiat. Res., 24, 3, 473-481.

BRUSTAD, T., 1964.

Influence of H_2S on the radiosensitivity of enzymes and microorganisms.
Radiat. Res. 22, 421-430.

BRYANT, P.E., 1968.

Survival after fractionated doses of radiation : modification by anoxia of the response of Chlamydomonas.
Nature, 219, 5149, 75-77.

BRYANT, P., 1969.

The effect of hypoxia on recovery in Chlamydomonas.
Brit. J. Radiol. 42, 497, 400.

BURLEW, J.S., 1953.

Algal culture from laboratory to pilot plant.
Carnegie institution of Washington. Publ. 600, 357 p.

CALKINS, J., 1967.

An unusual form of response in X-irradiated protozoa and a hypothesis as to its origin.
Int. J. Radiat. Biol., 12, 3, 297-301.

CECHÁCEK, Z., HILLOVA, J., 1970.

DNA synthesis and changes in radiosensitivity during the cell cycle of vegetative culture of Chlamydomonas reinhardi.
Int. J. Radiat. Biol., 17, 2, 127-134.

COHEN, L., 1968.

Theoretical "iso-survival" formulae for fractionated radiation therapy.
Brit. J. Radiol., 41, 522-528.

DALMON, J., 1969.

Décalage dans le temps entre les périodes de synthèse des acides désoxyribonucléiques majeur et satellite chez Chlorella pyrenoidosa.
C.R. Acad. Sc., 268, 4, 689-690.

DALMON, J., 1970.

Métabolisme des acides désoxyribonucléiques au cours du cycle cellulaire des Chlorelles.
Bull. Informations Scientifiques et Techniques CEA n° 145, 53,55.

DALMON, J., GILET, R., 1969.

Realization of synchronous axenic and dense Chlorella cultures.
Folia Microbiol. Prague, 14, 2, 97-103.

DALRYMPLE, G.V., SANDERS, J.L., BAKER, M.L., WILKINSON, K.P., 1969.

The effect of 2,4-Dinitrophenol on the repair of radiation injury by L. cells.
Radiat. Res., 37, 1,90-102.

DAVIES, D.R., 1966.

Patterns and rates of recovery in synchronous populations of algal cells exposed to gamma radiation.
Radiat. Res., 29, 2, 222-235.

DAVIES, D.R., 1969.

The induction and repair of radiation damage in Chlamydomonas.
Curr. Topics Radiat. Res., 5, 75-113.

DAVIES, D.R., THORBURN, M.A.P., 1968.

The effect of dose rate in relation to hypoxia and the role of repair systems in the green alga Chlamydomonas reinhardi.
Radiat. Res., 35, 2, 401-409.

DEERING, R.A., 1968.

Dictyostelium discoideum : a gamma-ray resistant organism.
Science, 162, 3859, 1289-1290.

DEWEY, D.L., 1963.

The X-ray sensitivity of Serratia marcescens.
Radiat. Res., 19, 1, 64-87.

DEWEY, D.L., 1964.

The effect of irradiation on the ability of Pseudomonas to synthesize two inducible enzymes.
Radiat. Res., 21, 3, 367-382.

DEWEY, W.C., MILLER, H.H., STONE, L.E., LEEPER, D.B., 1970.

Repair of sublethal and potentially lethal X-ray damage (chromosomal and cell killing) during the S phase of chinese hamster cells.
IVème Congrès International de Radiobiologie et de Physico-chimie des rayonnements, EVIAN, 29 juin-4 juillet 1970 - France.

DIENES, G.J., 1966.

A kinetic model of biological radiation response.
Radiat. Res., 28, 2, 183-202.

DONINI, P., EPSTEIN, H.T., 1965.

Sensitivity to X-rays and ultraviolet light of intracellular phase α^1.
Virology, 23, 359-367.

DRAGANIĆ, I.G., HOLM, N.W., MAUL, J.E., 1961.

Laboratory mammal for some high-level chemical dosimeter.
Risö Report n° 22.

ELKIND, M.M., dans SILINI, 1967.

Sublethal X-ray damage and its repair in mammalian cells.
Radiation Research : Proceedings of the Third International Congress of Radiation Research. Cortina d'Ampezzo, Italy. June-July 1966.
pp. 558-586, North-Holland Publishing Compagny, Amsterdam.

ELKIN, M.M., WHITMORE, C.F., 1967.

The Radiobiology of cultured mammalian cells.
GORDON and BREACH Science Publishers. New-York.

EL-SAYED, S.Z., LEE, B.D., 1963.

Evaluation of an automatic technique for counting unicellular organisms.
J. Mar. Res., 21, 2, 59-73.

ENGLAND, M.A., 1969.

Millipore filtrus studied in isolation and in vitro by transmission electron microscopy and stereoscanning electron microscopy.
Exp. cell. Res., 54, 2, 222-230.

EVANS, N.T.S., 1969.

Removal of dissolved oxygen from aqueous media by ionizing radiations.
Radiat. Effect., 1, 1, 19-22.

FÄHNRICH, P., 1965.

Inaktivierung von einzellegen algen mit röntgenstrahlen.
Radiat. Bot., 5, 6, 507-512.

FORSSBERG, A., 1933.

Der Zeitfaktor in der biologischen Wirkung von röntgenstrahlen.
Acta Radiol., 14, 399-407.

FOWLER, J.F., 1966.

Distributions of Hit-numbers in single targets.
Dans : Biophysical Aspects of Radiation Quality.
I.A.E.A. Vienne. Technical reports series n° 58.

FRICKE, H., HART, E.J., 1966.

Chemical dosimetry, pp. 167-239.
Dans ATTIX, F.H., ROESCH, W.C., 1966.
Radiation dosimetry
New-York, Londres, Academic Press.

FRIEDMAN, B., BLAIS, P., SHAFFER, P., 1968.

Fine structure of millipore filters.
J. Cell. Biol., 39, 1, 208-211.

FRINDEL, E., 1966.

Radiation effects on cellular kinetics.
Revue d'Energie Atomique, 4, 3, 3-38.

GROVER, N.B., NAAMAN, J., BEN-SASSON, S., DOLJANSKI, F., 1969.

Electrical sizing of particles in suspensions. I : Theory.
Biophys., J., 9, 11, 1398-1414.

GROVER, N.B., NAAMAN, J., BEN-SASSON, S., DOLJANSKI, F., NADAV, G., 1969.

Electrical sizing of particles in suspensions. II : Experiments with rigid spheres.
Biophys. J., 9 , 11, 1415-1425.

HALL, E.J., 1962.

A method of deducing a dose-response relationship for reproductive integrity of cells exposed to radiation by means of fractionation experiments.
Brit. J. Radiol., 35, 414, 398-402.

HALL, E.J., BEDFORD, J.S., 1964.

Dose rate : its effect on the survival of HeLa irradiated with γ rays.
Radiat. Res., 22, 2, 305-315.

HALL, E.J., BEDFORD, J.S., OLIVER, R., 1966.

Extreme hypoxia : its effect on the survival of mammalian cells irradiated at high and low dose-rates.
Brit. J. Radiol., 39, 460, 302-307.

HALL, E.J., CAVANAGH, J., 1969.

The effect of hypoxia on recovery of sublethal radiation damage in vicia seedlings.
Brit. J. Radiol., 42, 496, 270-277.

HAYNES, R.H., 1964.

Molecular localization of radiation damage relevant to bacterial inactivation 51-68.
In : AUGENSTEIN, L., MASON, R., ROSENBERG, P., 1964.
Physical Processes in Radiation Biology.
Academic Press.

HILLOVÁ, J., DRÁŠIL, V., 1967.

The inhibitory effect of iodoacetamide on recovery from sublethal damage in Chlamydomonas reinhardi.
Int. J. Radiat. Biol., 12, 3, 201-208.

HOWARD, A., 1968.

The oxygen requirement for recovery in split-dose experiments with Oedogonium.
Int. J. Radiat. Biol., 14, 4, 341-350.

HURWITZ, C., TOLMACH, L.J., 1969.

Time lapse cinemicrographic studies of X-irradiated HeLa S3 cells.
I : Cell progression and cell disintegration.
Biophys. J., 9, 4, 607-633.

HURWITZ, C., TOLMACH, L.J., 1969.

Time-lapse cinemicrographic studies of X-irradiated HeLa S3 cells.
II : Cell fusion.
Biophys. J., 9, 9, 1131-1143.

JAMES, T.W., ANDERSON, N.G., 1963.

Continuous recording of cell number in logarithmic and synchronized cultures.
Science, 142, 3596, 1183-1184.

JAMES, A.P., WERNER, M.M., 1966.

Radiation-induced genetic mosaicism and lethal sectoring in yeast.
Mutat. Res., 3, 6, 477-485.

JAMES, A.P., WERNER, M.M., SAUNDERS, A.S., HARRIS, M.A., 1968.

Persistance of X-ray-induced lethal sectoring in yeast.
Radiat. Res., 34, 3, 475-487.

KLÍMEK, M., VLAŠÍNOVÁ, M., 1963.

Independence of the increase in volume of X-irradiated HeLa cells on radiation doses.
Folia Biol., Prague, 9, 314-318.

KOUCHKOVSKY, Y. de, 1963.

Induction photosynthétique des chloroplastes isolés.
Physiol. Veg., 1, 15-76.

LANCZOS, C., 1956.

Applied analysis.
Englewood Cliffs, Prentice Hall.

LANGE, C.S., 1970.

On the relative importance of repair and progression in Elkind recovery as measured in synchronous HeLa cells.
Int. J. Radiat. Biol., 17, 1, 61-79.

LANGE, C.S., 1970.

On the relative importance of repair and progression in Elkind recovery as measured in synchronous HeLa cells.
Int. J. Radiat. Biol., 17, 1, 61-79.

LAW, J., 1970.

The consistency of $FeSO_4$ dosimetry.
Phys. Med. Biol., 15, 2, 301-309.

LEE, H., RICHARDS, V., 1965.

Effect of X-irradiation on changes of cell distribution curve of Mouse Bone Marrow as detected by electronic particle counting.
Nature, 205, 4973, 820-821.

LEGRYS, G.A., HALL, E.J., 1969.

The oxygen effect and X-ray sensitivity in synchronously dividing cultures of Chinese Hamster cells.
Radiat. Res., 37, 1, 161-172.

LIVERSAGE, W.E., 1966.

The application of cell survival theory to high dose-rate intracavitary therapy.
Brit. J. Radiol., 39, 461, 338-349.

Mc CRORY, G.J., GRUN, P., 1969.

Relationship between radiation dose rate and lethality on diploïd clones of Solanum.
Radiat. Bot., 9, 1, 27-32.

MAGNI, G.E., 1960.

The problem of evaluating the biological significance of sigmoïdal X-ray inactivation curves in yeasts.
Nuovo cimento (10) 18 Suppl. n° 2, 221-226.

MALONEY, T.B., DONOVAN, E.J., ROBINSON, E.L., 1961.

Determination of numbers and sizes of algal cells with an electronic particle counter.
Presented at a meeting of the American Institute of Biological Sciences, published by Phycologia.

MILLER, D.R., 1970.

Theoretical survival curves for radiation damage in Bacteria.
J. Theor. Biol., 26, 3, 383-398.

MOYSE, A., 1956.

Etude de la croissance d'Algues monocellulaires (Chlorelles et espèces voisines) en cultures accélérées. II : Vitesse de croissance et milieux de culture.
J. Rech. CNRS, 35, 177-192.

MUNTZ, K., 1969.

Über Wachstum und Stoffwechsel von Chlorella pyrenoidosa während Kälteeinwirkung im Dunkeln.
Flora, 160, 2, 139-157.

MURAKAMI, S., MORIMURA, Y., TAKAMIYA, A., 1963.

Electron microscopic studies along cellular life cycle of Chlorella ellipsoïdea.
Microalgae et Photosynthetic Bacteria, 65-83.

MURAKAMI, A., TEULADE, P., 1969.

Variation of radiosensitivity in synchronized cell populations of silkworm embryos exposed to X-rays.
Int. J. Radiat. Biol., 15, 4, 315-322.

NAZIROV, N.N., KAMENEVA, V.P., 1962.

La stabilité de différentes algues vis-à-vis des rayons γ et les relations entre elles et les conditions d'alimentation minérale.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR., 7, 58-61.

NEARY, G.J., 1965.

Chromosome aberrations and the theory of RBE I : General considerations.
Int. J. Radiat. Biol., 9, 5, 477-502.

NEARY, G.J., SAVAGE, J.R.K., 1966.

Chromosome aberrations and the theory of RBE II : Evidence from track-segment experiments with protons and alpha particles.
Int. J. Radiat. Biol., 11, 3, 209-223.

NEARY, G.J., SAVAGE, J.R.K., EVANS, H.J., WHITTLE, J., 1963.

Ultimate maximum values of the RBE of fast neutrons and gamma-rays for chromosome aberrations.
Int. J. Radiat. Biol., 6, 2, 127-136.

NEČAS, J., 1969.

Influence of light on the autospore number of some Chlorococcal Algae.
Biol. Plant., 11, 6, 465-469.

NIAS, A.H.W., FOX, M., 1968.

Minimum clone size for estimating normal reproductive capacity of cultured cells.
Brit. J. Radiat., 41, 486, 468-474.

OLIVER, R., 1964.

A comparison of the effects of acute and protracted gamma-radiation on the growth of seedlings of Vicia faba. Part II : Theoretical calculations.
Int. J. Radiat. Biol., 8, 5, 475-488.

ORR, J.S., HOPE, C.S., WAKERLEY, S.E., STARK, J.M., 1966.

A metabolic theory of cell survival curves.
Phys. Med. Biol., 11, 103-108.

PALACIOS, R., CONTRERAS, G., ESPEJOS, R., JIMENEZ, R., OHLBAUM, A., TOHA, J., 1963.

Compound survival curve of vaccinia-virus after gamma radiation.
Biochim. Biophys. Acta, 68, 1, 149-151.

PAULY, H., RAJEWSKY, B., 1963.

Application of the target theory to multistep reactions.
Radiat. Res., 18, 4, 409-420.

PIETSCHMANN, K., 1937.

Über Bestrahlung von Chlorella vulgaris mit Röntgenstrahlen.
Arch. Mikrobiol., 8, 180-206.

PIKE, M.O., ALPER, T., 1964.

A method for determining dose - modification factors.
Brit. J. Radiol., 37, 438, 458-462.

POHLIT, W.E., 1970.

Recovery and repair of radiation damage in yeast.
IVème Congrès International de Radiobiologie et de Physicochimie des rayonnements, EVIAN, 29 juin - 4 juillet 1970, France.

PORTER, E.H., 1963.

Extrapolation numbers.
Brit. J. Radiol., 36, 425, 372-377.

PORTER, E.H., 1970.

Estimation of extrapolation numbers.
Brit. J. Radiol., 43, 507, 224-225.

PORTER, J.W., KNAUSS, H.J., 1954.

Inhibition of growth Chlorella by β emitting radioisotopes.
Plant. Physiol., 29, 60.

PORTER, J.W., WATSON, M.S., 1954.

Gross effects of grow-inhibiting levels of Tritium oxide on Chlorella pyrenoidosa.
Amer. J. Bot., 41, 7, 550-555.

POSNER, H.B., 1965.

Effects of gamma irradiation on growth, colony-forming ability and some cellular constituents of Chlorella pyrenoidosa.
Radiat. Bot., 5, 2, 129-141.

POSNER, H.B., SPARROW, A.H., 1964.

Survival of Chlorella and Chlamydomonas after acute and chronic gamma radiation.
Radiat. Bot. 4, 3, 253-257.

PUCK, T.T., 1965.

Cell turnover in mammalian tissues : use of cell depletion measurements to calculate X-ray reproductive survival curves in vivo.
Proc. Nat. Acad. Sci., 54, 1797-1803.

READ, J., 1965.

The induction of chromosome exchange aberrations by Ionizing radiations : the "site concept".
Int. J. Radiat. Biol., 9, 1, 53-65.

READ, J., 1966.

Dependence of the numbers of 2-break chromosomes aberrations on the size of the dose of ionizing radiation.
Radiat. Bot., 6, 6, 489-498.

REVELL, S.H., 1966.

Evidence for a dose-squared term in the dose-response curve for real chromatid discontinuities induced by X-rays, and some theoretical consequences thereof.
Mutat. Res., 3, 1, 34-53.

ROBINSON, D.M., 1965.

"Cell killing" in radiobiology.
Nature, 208, 5009, 500.

ROSENBERG, H.M., GREGG, E.C., 1969.

Kinetics of cell volume changes of murine lymphoma cells subjected to different agents in vitro.
Biophys. J., 9, 4, 592-606.

ROUX, J.C., 1970.

Radiosensibilité des Chlorelles aux particules alpha.
Bull. Informations Scientifiques et Techniques, 145, 61-66.

SHIBATA, K., MORIMURA, Y., TAMIYA, H., 1964.

Precise measurement of the change of statistical distribution of cell size occurring during the synchronous culture of Chlorella.
Plant. Cell Physiol., 5, 3, 315-320.

SILINI, G., 1967.

Radiation Research.
Proceedings of the Third international Congress of Radiation Research held at Cortina d'Ampezzo, Italy, June-July, 1966.
North-Holland Publishing Company. Amsterdam.

SINCLAIR, W.K., 1964.

X-ray-induced heritable damage (small-colony formation) in cultured mammalian cells.
Radiat. Res., 21, 4, 584-611.

SINCLAIR, W.K., 1966.

The shape of radiation survival curves of mammalian cells cultured in vitro.
Biophysical Aspect of Radiation Quality, I.A.E.A. Vienne, Technical Reports Series, n° 58.

SKARSGARD, L.D., JOHNS, H.E., 1961.

Spectral flux density of scattered and primary radiation generated at 250 kV.
Radiat. Res., 14, 3, 231-260.

SMITH, L.L., 1961.

Algae : radioactivity uptake and irradiation effects.
A/ Litterature search.
Déclassé TID : 11 749.

SOESTBERGEN, A.A. van, 1962.

The effect of ionizing radiation on Pseudomonas aeruginosa et various oxygen-concentrations.
Int. J. Radiat. Biol., 5, 4, 353-367.

SUMERE, C. van, HOLM-HANSEN, O., 1957.

Effect of gamma-radiation on photosynthesis and viability of Chlorella.
UCRL - 3836.

THOMPSON, L.H., SUIT, H.D., 1969.

Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells studied with time-lapse photography. ii
Int. J. Radiat. Biol., 15, 4, 347-362.

TILL, J.E., 1963.

Quantitative aspects of radiation lethality at the cellular level.
Amer. J. Roentgenol. Radium Therapy Nucl. Med., 90, 5, 917-927.

TODD, P., 1967.

Heavy-ion irradiation of cultured human cells.
Radiat. Rest., supp. 7, 196-207.

VAN'T HOF, J., 1970.

Postirradiation hypoxia and the recovery of G1 and G2 cells and DNA synthesis in cultured root meristems.
Radiat. Res., 41, 3, 538-551.

VIZDALOVA, M., LISKA, B., 1966.

Radiosensitivity of Escherichia coli B bacteria containing different amounts of nucleic acids and proteins.
Folia Microbiol. Prague, 11, 1, 21-28.

WALKER, J.B., 1953.

Inorganic micronutrients requirements of Chlorella. I : Requirements for Calcium (or Strontium), Copper and Molybdenum.
Arch. Biochem. Biophys., 46, 1-11.

WANKA, F., 1965.

The use of Colchicine in investigation of the life cycle of Chlorella.
Arch. Mikrobiol., 52, 4, 305-318.

WETHERELL, D.F., KRAUSS, R.W., 1957.

X-ray induced mutations in Chlamydomonas eugametos.
Amer. J. Bot., 44, 7, 609-618.

YOCKEY, H.P., 1958.

Some introductory ideas concerning the application of information theory in biology.
Symposium on information theory in biology.
GATLINBURG, Tennessee, October 29-31, 1956.
London Pergamon Press.

ZAKHAROV, Y.A., TOUGARINOV, V.V., 1964.

Radiosensibilité de l'algue monocellulaire Chlorella vulgaris.
Radiobiologija, 4, 1, 92-95.

ZELLNER, S.R., GUSTIN, D.F., BUCK, J.D., MAYERS, S.P., 1963.

Growth and multiplication of Rhodoterula glutinis as determined by viable and total cell counts.
J. Microbiol. Serol., 29, 2, 203-210.

Manuscrit reçu le 24 novembre 1970

Vu et approuvé
Grenoble, le 6 novembre 1970
Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Grenoble

E. BONNIER

Vu
et Permis d'Imprimer
Le Recteur de l'Académie
de Grenoble

M. NIVEAU